

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische
Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand (Lehrstuhl Bakteriologie): Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann

Der Biomarker IP-10
für die Diagnose der aktiven Tuberkulose und der latenten
Tuberkuloseinfektion im Kindesalter

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Neele Alsleben

aus
Berlin
2014

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Betreuer: Dr. med. Klaus Magdorf

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Holger Rüssmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Hoelscher

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2014

Teile der Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Alsleben N., Ruhwald M., Rüssmann H., Marx F.M., Wahn U., Magdorf M.
(2012) Interferon-gamma inducible 10 as a biomarker for active and latent tuberculosis infection in children: a case-control study. *Scand J Infect Dis.* 44(4):256-62. (PMID:22103555)

In Erinnerung an

Dr. Klaus Magdorf

Der Biomarker IP-10 für die Diagnose der aktiven Tuberkulose und der latenten Tuberkuloseinfektion im Kindesalter

1. Einleitung.....	1
1. Überblick zur Tuberkulose.....	1
2. Tuberkulose im Kindesalter: Charakteristika und Besonderheiten.....	4
2.1 Epidemiologie	4
2.2 Pathogenese und Klinik	5
2.2.1 Latente Tuberkuloseinfektion.....	6
2.2.2 Aktive Tuberkulose.....	6
2.2.2.1 Primärtuberkulose	6
2.2.2.2 Postprimäre Tuberkulose.....	7
2.2.2.3 Komplikationen.....	7
2.3 Differentialdiagnosen	8
2.4 Diagnostik.....	9
2.5 Prävention	10
2.6 Therapie.....	11
3. Immunantwort und immunbasierte Diagnostik speziell im Kindesalter.....	11
3.1 Unspezifische und zelluläre Immunantwort auf <i>M. tuberculosis</i>	11
3.2 Bedeutung der immunbasierten Diagnostik.....	13
3.3 Prinzip, Verfahrensweise und diagnostische Einschränkungen immunbasierter Testverfahren.....	13
3.3.1 Tuberkulin-Haut-Test.....	13
3.3.2 <i>In-vitro</i> Testverfahren.....	14
3.3.2.1 T-Zell-vermittelt	14
3.3.2.2 B-Zell-vermittelt	17
3.4 Neue Biomarker	17
4. Stand der Forschung: Chemokin IP-10 als Biomarker bei Tuberkulose.....	18
4.1 IP-10 als Chemokin	18
4.2 IP-10 als Biomarker.....	19
4.2.1 IP-10 als Biomarker bei nicht-tuberkulösen Erkrankungen	20
4.3 IP-10 und Kindertuberkulose	21
2. Ziele der Arbeit.....	22
1. Hauptziel.....	22
2. Einzelziele	22
3. Methoden	23
1. Studiendesign	23
1.1 Art der Studie	23
1.2 Auswahl der Studienteilnehmer.....	23
1.2.1 Einteilung der Studiengruppen	24
1.2.1.1 TB.....	24
1.2.1.2 LTBI.....	24
1.2.1.3 NTM.....	24
1.2.1.4 AWI.....	25
1.2.2 Ausschlusskriterien	25

2. Datenerhebung und -verwaltung	26
3. Experimenteller Studienanteil: IP-10-Bestimmung	27
3.1 Probengewinnung	27
3.2 Probentransport	28
3.3 IP-10-ELISAs	28
3.3.1 Materialliste	28
3.3.2 Durchführung	30
3.3.2.1 Vorbeschichtung der Messplatten	30
3.3.2.2 Herstellung des Standards	30
3.3.2.3 Probenverdünnung	31
3.3.2.4 Nachweis von IP-10	31
4. Datenverwaltung	33
5. Datenanalyse	33
5.1 IP-10-Konzentrationen in den drei Stimulationsmodi	33
5.2 Unterscheidung LTBI vs. TB	33
5.3 Korrelation und Konkordanz der IP-10- und QFT-IT-Ergebnisse	34
5.4 Korrelation von IP-10 Konzentration und Alter der Patienten	34
6. Ethik	34
4. Ergebnisse	35
1. Charakteristika der Studienpopulation	35
2. IP-10-Konzentration in den drei Stimulationsmodi	36
2.1 TB-Gruppe	36
2.2 LTBI-Gruppe	37
2.3 NTM-Gruppe	37
2.4 AWI-Gruppe	38
2.5 TB-, LTBI-, NTM- und AWI-Gruppe im Vergleich	39
3. Unterscheidung von TB und LTBI	39
4. Vergleich des IP-10-Testes mit dem QFT-IT-Test	40
4.1 Konkordanz	40
4.2 Korrelation	42
5. Korrelation der IP-10-Sekretion mit dem Alter	43
5. Diskussion	45
1. IP-10-Plasmakonzentration nach spezifischer M. tuberculosis -Antigen-Stimulation	45
2. IP-10 als Biomarker zur Unterscheidung zwischen aktiver TB und LTBI	48
3. Der IP-10-Test im Vergleich zu etablierten immunbasierten Testverfahren zur TB- und LTBI-Diagnostik	50
4. Diagnostische Vor- und Nachteile des Biomarkers IP-10	52
5. Einschränkungen der Studie	56
6. Zukunftsperspektiven	57
7. Schlussfolgerung	59
6. Zusammenfassung	60
1. Zusammenfassung	60
2. Summary	61
7. Danksagung	64
8. Literaturverzeichnis	66
9. Anhang	78
1. Abkürzungsverzeichnis	78
2. Ethikvotum	79
3. Eidesstaatliche Versicherung	81

1. Einleitung

1. Überblick zur Tuberkulose

Die Tuberkulose ist eine durch *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) verursachte Infektionskrankheit, welche die Menschheit bereits seit Jahrtausenden begleitet. Die ältesten Funde des Erregers stammen aus der Zeit 9000 v. Chr. Aus Knochenfunden einer Frau und ihrem Kind konnte mittels DNA-Analyse *M. tuberculosis* isoliert werden [Hershkovitz et al., 2008]. In der Antike beschäftigte sich Hippokrates mit der Erkrankung und beschreibt die „phthisis“ (griechisch: Schwund) als „...in der Zeit häufigste und unaufhaltsam in den Tod führende Erkrankung“ [Herzog, 1998]. Von der Antike bis zur frühen Neuzeit schien dann die Pest das Leid der Menschen zu bestimmen.

Insbesondere mit der Urbanisierung trat die Tuberkulose als epidemische Erkrankung wieder in den Vordergrund. In London des 17. Jahrhunderts schätzte man die Tuberkulose-Prävalenz auf 1.000 pro 100.000 Einwohner [Krause, 1928]. Die hohen Fallzahlen führten auch dazu, dass sich Wissenschaftler vermehrt mit dem Rätsel der Pathogenese der Tuberkulose beschäftigten. Während man über Jahrhunderte eine hereditäre Ätiologie der Erkrankung vermutete, beschrieb der englische Mediziner Benjamin Marten 1720 erstmalig, dass er eine infektiöse Übertragung durch einen Organismus für wahrscheinlicher hält. Einen Meilenstein in der Erforschung der Tuberkulose setzte der deutsche Mediziner und spätere Nobelpreisträger Robert Koch 1882 mit der Isolierung von *M. tuberculosis* als Erreger der Tuberkulose [Koch, 1882]. Während des ersten und zweiten Weltkrieges stieg die Tuberkulose-Inzidenz und Mortalität der betroffenen Länder dramatisch an [Smallman-Raynor und Cliff, 2004]. Nach dem zweiten Weltkrieg mit Verbesserung der sozialen Umstände und Entwicklung der antimykobakteriellen Chemotherapie sank die Tuberkulose-Inzidenz. In Ländern mit niedrigem Einkommen, Überbevölkerung und hoher Prävalenz des Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV) verbleiben die Tuberkulose-Fallzahlen jedoch hoch [Tamm, 1990]. 1993 erklärte die World Health Organization (WHO) die Tuberkulose zum „global emergency“ (WHO, 1993).

Die Tuberkulose-Fallzahlen sind seit 2002 rückläufig, dennoch erkrankten 2011 laut Schätzungen der WHO weltweit 8,7 Millionen Menschen neu oder rezidivierend an Tuberkulose. 13 % der Erkrankten sind mit HIV ko-infiziert. Über 60.000 Fälle von „multidrug-resistent“ (MDR) Tuberkulosefälle wurden 2011 in Ländern mit hoher Tuberkulose-Prävalenz registriert. Die regionalen Unterschiede der Tuberkulose-Inzidenzen sind in Abbildung 1 dargestellt [WHO, 2012].

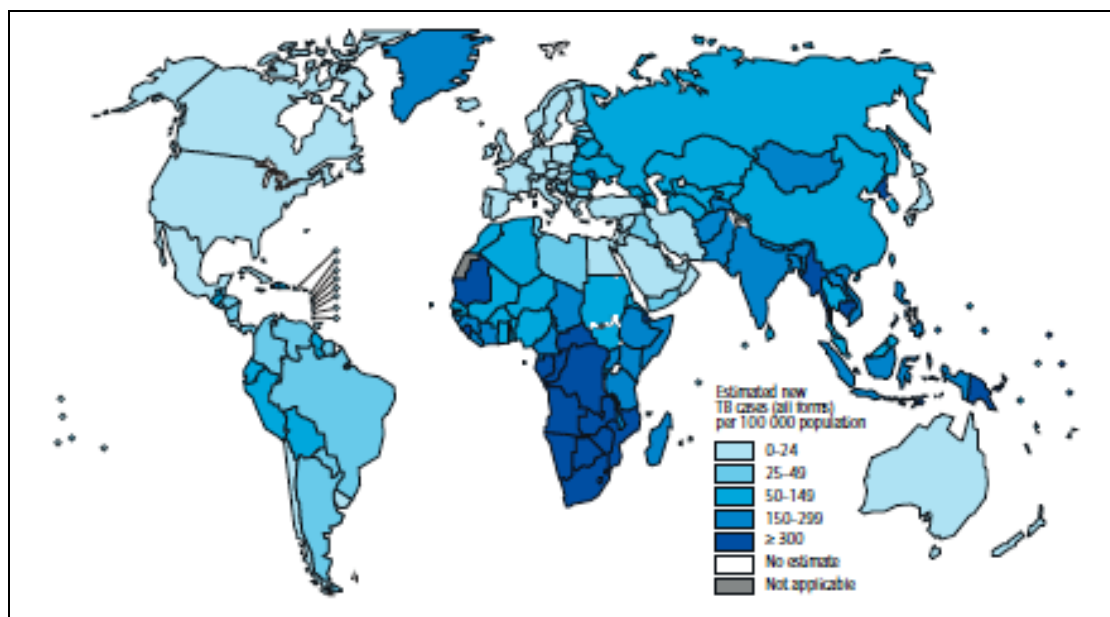


Abbildung 1 stellt die regionalen Unterschiede der geschätzten Tuberkulose Inzidenzraten für 2011 dar. (Die Verwendung der Abbildung wurde freundlicherweise von der WHO genehmigt.© WHO, 2012, alle Rechte vorbehalten)

Die Erreger der Tuberkulose werden als *M. tuberculosis*-Komplexes zusammengefasst. Zu diesem Erreger-Komplex zählt *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium africanum* und *Mycobacterium canetti* [Schaaf und Zumla, 2009, S.50]. Einige Erreger bevorzugen als Wirt Tiere wie Rinder, Ziegen und Seehunde.

Bei der humanen Tuberkulose wird als Erreger am häufigsten *M. tuberculosis* detektiert. Es ist wie die anderen Spezies ein aerobes, grampositives Stäbchenbakterium. Dazu besitzt es eine komplex aufgebaute lipidreiche

Zellwand, welche unter anderem die Ursache für seine Pathogenität und Resistenz gegen viele Antibiotika ist. Als lipophile und aerobe Organismen halten sich die Mykobakterien in Flüssigkeiten, wie zum Beispiel Sputum, in Aerosolen auf.

M. tuberculosis wird meist durch Inhalation von Mykobakterien-enthaltenden Aerosolen von Mensch zu Mensch übertragen. Die inhalierten Mykobakterien gelangen in die unteren Atemwege und initiieren dort zunächst eine unspezifische Immunreaktion, auf diese folgt zeitlich verzögert die spezifische T-Zell-vermittelte Immunreaktion.

Nach erstmaliger *M. tuberculosis*-Exposition infiziert sich der Exponierte entweder mit dem Erreger und es kommt zu einer Primärinfektion oder das Immunsystem ist in der Lage, die Mykobakterien gänzlich abzutöten, und es findet keine Infektion statt. Die Primärinfektion manifestiert sich entweder als latente Tuberkuloseinfektion, bei der der Erreger in einem inaktiven Zustand über Jahre latent überdauern kann, oder als Primärtuberkulose.

Symptome der Primärtuberkulose können Lymphadenopathie, Fieber, Gewichtsverlust und Nachtschweiß sein, allerdings kann die Erkrankung auch asymptomatisch verlaufen.

Eine postprimäre Tuberkulose kann durch Reaktivierung einer latenten Tuberkuloseinfektion oder seltener durch Re-Infektion mit *M. tuberculosis* entstehen. Meist manifestiert sich die granulomatöse Erkrankung als pulmonale Tuberkulose in den Lungen. Husten über 2 Wochen, subfebrile Temperaturen, Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Abgeschlagenheit sind klassische Symptome einer pulmonalen Tuberkulose. Sind andere Organe als die Lunge betroffen, wird von einer extrapulmonalen Tuberkulose gesprochen. Bei der extrapulmonalen Tuberkulose treten neben der B-Symptomatik weitere organspezifische Symptome auf. Eine Miliartuberkulose liegt bei hämatogener Dissemination des Erregers vor.

Diagnostiziert wird die aktive Tuberkulose (Primärtuberkulose oder post-primäre Tuberkulose) primär mikrobiologisch, wobei die kulturelle Anzucht der Mykobakterien der Gold-Standard ist. Des Weiteren stehen die mikroskopische Untersuchungen und Nukleinsäureamplifikationstechnik (NAT) sowie

bildgebende Verfahren zur Verfügung. Die Diagnose einer latenten Tuberkulose wird anhand von Kontaktanamnese, individueller Risikoevaluierung und immunbasierter Tests wie Tuberkulin-Hauttest (THT) und IFN-gamma (IFN- γ) Release Assays (IGRA) gestellt [Herold, 2010].

Zur Behandlung einer aktiven Tuberkulose, ohne Risikofaktoren für eine Medikamentenresistenz, werden als Erstrangmedikamente eine Kombinationstherapie bestehend aus Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol über zwei Monate verabreicht (Anfangsphase) und anschließend Isoniazid und Rifampicin für weitere 4 Monate (Konsolidierungsphase). Bei Resistenzen gegen genannte Antituberkulostatika können unter anderem weitere Aminoglykoside und Fluorchinolone eingesetzt werden. Zur Therapie der latenten Tuberkuloseinfektion wird Isoniazid für 9 Monate, eine Rifampicin Monotherapie für 4 Monate oder eine Kombinationstherapie aus Isoniazid und Rifampicin für 3 bis 4 Monate empfohlen [Schaberg et al., 2012].

2. Tuberkulose im Kindesalter: Charakteristika und Besonderheiten

2.1 Epidemiologie

Laut Schätzungen der WHO sind im Jahr 2011 weltweit mindestens 490.000 Kinder (< 15 Jahre) an einer Tuberkulose erkrankt. 64.000 Kinder verstarben weltweit an den Folgen der Erkrankung. Etwa Dreiviertel der Fälle treten in den Tuberkulose-Hochinzidenzländern auf. Es ist eine weit höhere Tuberkulose-Inzidenz und -Prävalenz im Kindesalter wahrscheinlich, da die Datenerhebung von Tuberkulose-Fällen im Kindesalter schwierig ist. Die Tuberkulose im Kindesalter kann häufig nicht durch eine positive Kultur bewiesen werden und Informationen über Tuberkulose-Fälle bei Kindern werden selten von nationalen Tuberkulose-Programmen erfasst [WHO, 2012; Nelson und Wells, 2004; Donald et al., 2007].

Europaweit wurde für die Länder der Europäischen Union (EU) und der Europäischen Handelsgesellschaft (EEA) für 2011 eine Tuberkulose-Melderate der 0-14-Jährigen von 6,7 pro 100.000 Einwohner ermittelt. Im Vergleich zu Vorjahren ist die Fallzahl im Kindesalter in Ländern hoher Tuberkulose-Prävalenz zurückgegangen. In Ländern geringer Tuberkulose-Prävalenz hingegen stagnierte die Melderate. In zehn der 29 Staaten, inklusive Deutschland, traten mehr als die Hälfte der registrierten Kinder-Tuberkulose-Fälle bei Kindern unter fünf Jahren auf [European Centre for Disease Prevention and Control, 2013].

Für 2011 wurden deutschlandweit 179 Tuberkulose-Neuerkrankungen bei Kindern unter 15 Jahren registriert. Dies entspricht einer Tuberkulose-Inzidenz für die unter 15-Jährigen von 1,7 pro 100.000 Einwohner. Im Vergleich zu den Vorjahren stieg die Inzidenz im Kindesalter minimal und kontinuierlich an [Robert Koch-Institut, 2012].

2.2 Pathogenese und Klinik

Die Infektion mit *M. tuberculosis* findet meist über die Inhalation von in kleinsten sogenannten „droplet nuclei“ abgehusteten Mykobakterien statt. Die Wahrscheinlichkeit der Infektion steigt mit der Infektiosität der erkrankten Person (Sputumpositivität) aber auch der Dauer und Intensität der Exposition. Ist die Bezugsperson eines Kindes an einer aktiven Tuberkulose erkrankt, ist das Kind dem Bakterium besonders stark ausgesetzt und dadurch entsteht ein erhöhtes Infektionsrisiko [Feja und Saiman, 2005].

Die inhalierten Mykobakterien-enthaltenden Aerosole gelangen in die respiratorischen Epithelien der unteren Atemwege. Hier initiieren die lokalen Immunzellen die immunologische Antwort auf die Erreger.

Nach Exposition mit *M. tuberculosis* findet entweder eine vollständige Eliminierung der Bakterien oder eine primäre Tuberkuloseinfektion statt [Marais, Gie, Schaaf, Beyers et al., 2006]. Bei der Primärinfektion kommt es zur Ausbildung des Primärkomplexes, bestehend aus dem im Lungenparenchym

lokalisierten Epitheloid-Granulomen (Ghon-Fokus) und einer lokalen Lymphknotenbeteiligung (Primär- oder Ghon-Komplex).

2.2.1 Latente Tuberkuloseinfektion

Nach Infektion mit *M. tuberculosis* migrieren Epitheloidzellen, Makrophagen und Lymphozyten zum Entzündungsort. Makrophagen inkorporieren die Mykobakterien und formieren sich mit Hilfe der anderen Immunzellen zu sehr kleinen Epitheloid-Granulomen, welche in der Röntgenaufnahme des Thorax nicht darstellbar sind [Ulrichs et al., 2005]. Die Mykobakterien sind wiederum in der Lage mesenchymale Stammzellen anzulocken, welche Stickoxide freisetzen, um so die Immunantwort weiterer Lymphozyten zu unterdrücken. Es wird vermutet, dass die Mykobakterien über diesen Mechanismus eine Balance zwischen Toxizität und Immunabwehr des Wirtes schaffen und somit im Wirt über Jahrzehnte latent überleben können [Raghuvanshi et al., 2010]. Die Pathogenese der latenten Tuberkuloseinfektion ist allerdings noch nicht gänzlich verstanden.

2.2.2 Aktive Tuberkulose

2.2.2.1 Primärtuberkulose

Mit *M. tuberculosis* primär infizierte Säuglinge haben ein 40%iges Risiko eine Primärtuberkulose zu entwickeln. Dieses Risiko nimmt mit steigendem Alter ab [Marais, Donald et al. 2005; Beyers et al., 1997; Ling et al., 2011]. Bei der Primärtuberkulose kommt es insbesondere bei den unter 5-Jährigen zu einer ausgeprägten Lymphadenopathie. Durch die relativ kleinen Bronchien und großen Lymphknoten mit assoziierten Ödemen kann es zur Atemwegsobstruktion kommen [Marais, Gie, Schaaf, Beyers et al. 2006]. Die zentrale Nekrose des Granuloms kann sich auf das umliegende Lungenparenchym und die Bronchien ausweiten, welche teilweise radiologisch als Kavernen sichtbar werden [Marais, Donald et al., 2005]. Erste klinische Erkrankungszeichen können verspätet auftreten und sehr unspezifisch sein. Symptome sind: Husten über 2 Wochen, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Nachtschweiß, subfebrile Temperaturen und ein generelles Fatigue-Syndrom

[Magdorf und Detjen, 2008]. Säuglinge und unter 3-Jährige sind insbesondere gefährdet, eine tuberkulöse Meningitis oder eine Miliartuberkulose zu entwickeln [Marais; Gie; Schaaf; Hesselning; Enarson; Beyers 2006]. Besonders schwere Ausprägungen der Tuberkulose treten häufig bei immungeschwächten Kindern, beispielsweise bei HIV-Ko-Infektion, auf. [Marais, Gie, Schaaf, Hesselning et al., 2006; Lewinsohn et al., 2004].

2.2.2.2 Postprimäre Tuberkulose

Eine postprimäre oder „adult-type“ (Englisch: Erwachsenen-Typ) Tuberkulose kann nach Jahren Latenzzeit durch endogene Reaktivierung einer früheren Primärinfektion oder durch Re-Infektion entstehen [Schaaf und Zumla, 2009, S.133-45]. Pubertierende Jugendliche sowie immunsupprimierte Patienten sind von der Ausbildung einer postprimären Tuberkulose gefährdet [Marais, Donald et al., 2005].

Erste unspezifische Symptome sind Husten, Appetitlosigkeit und Abgeschlagenheit. Mit fortschreitender Erkrankung stehen Symptome wie chronischer Husten, Brustschmerz, Lethargie, Anorexie und Nachtschweiß im Vordergrund [Marais, Gie, Schaaf, Hesselning et al., 2006].

2.2.2.3 Komplikationen

Eine häufige Komplikation der pulmonalen Tuberkulose ist die verkäsende Einschmelzung der Granulome, die zur Destruktion des Lungenparenchyms und Bronchialsystems führt.

Eine extrapulmonale Tuberkulose entsteht durch lokale, aber auch durch hämatogene oder lymphogene Ausbreitung der Bakterien. Häufig manifestiert sich die extrapulmonale Tuberkulose als periphere Lymphadenopathie. Die geläufige Manifestation im Zentralen-Nervensystem wird als tuberkulöse Meningitis bezeichnet. Bei später Diagnosestellung ist die tuberkulöse Meningitis häufig letal oder mit Langzeitschäden assoziiert. Als weitere extrapulmonale Organe können unter anderem der Gastrointestinal-Trakt, die Wirbelsäule, die Dermis oder der Urogenital-Trakt betroffen sein.

Die Miliartuberkulose beschreibt die hämatogene, generalisierte Ausbreitung des Erregers und kann sowohl die Lungen mit der pathognomonischen hirsekornartigen Darstellung in der Thorax-Röntgenaufnahme, als auch alle extrapulmonalen Organe betreffen. Klinische Kennzeichen sind: Fieber, Anorexie, Abgeschlagenheit und Luftnot mit der Gefahr einer Ateminsuffizienz. Eine seltene Maximalausprägung der Miliartuberkulose ist die häufig letal verlaufende Landouzy-Sepsis [Marais, Donald et al., 2005; Marais, Gie, Schaaf, Beyers et al. 2006; Magdorf und Detjen, 2008; Schaaf und Zumla, 2009, S.133-45].

2.3 Differentialdiagnosen

Die Symptome der Tuberkulose im Kindesalter sind unspezifisch. Präsentiert sich der Patient mit Husten, Abgeschlagenheit und Fieber bei negativer Kontaktanamnese zu *M. tuberculosis*, ist eine virale oder bakterielle Atemwegsinfektion in Ländern mit niedriger Tuberkulose-Inzidenz die wahrscheinliche Diagnose. In Ländern mit hoher Tuberkulose-Inzidenz ist die Differenzierung von an Tuberkulose erkrankten und nicht an Tuberkulose erkrankten Kindern schwierig [Marais, Gie et al., 2005]. Persistierender, nicht direkt übertragbarer Husten und plötzlich einsetzende, persistierende Abgeschlagenheit gelten als spezifische und sensitive Symptome einer Tuberkulose im Kindesalter [Marais, Gie et al., 2005].

Bei Symptomen wie Lymphadenopathie, Gewichtsverlust, Fieber und Abgeschlagenheit ist auch eine maligne Erkrankung differentialdiagnostisch in Betracht zu ziehen.

Eine Lymphadenopathie kann auch Zeichen einer durch nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) ausgelösten Erkrankung sein. Patienten, die sich mit einer unilateralen, zervikalen, indolenten und Antibiotika-resistenten Lymphadenopathie präsentieren, sollten auch auf eine NTM-Erkrankung untersucht werden. Diese wird am häufigsten durch *Mycobacterium avium* oder *Mycobacterium intercellulare* verursacht [Magdorf und Detjen, 2008; Griffith et al., 2007]. In Ländern mit niedriger Tuberkulose-Prävalenz wie Deutschland ist die Inzidenz der NTM-Erkrankungen verglichen mit der der Tuberkulose-Inzidenz in der gleichen Altersgruppe höher [Cassidy et al., 2009].

2.4 Diagnostik

Die Diagnose der Tuberkulose stellt im Kindesalter eine besondere Herausforderung dar [Marais, Gie, Schaaf, Beyers et al., 2006]. Ursache dafür sind die unspezifischen Symptome der Tuberkulose und die geringere Sensitivität der immunologischen sowie bildgebenden Testverfahren.

Zur Diagnose einer latenten Tuberkuloseinfektion wird zunächst anamnestisch das Risiko einer *M. tuberculosis*-Exposition beurteilt. Dies ist speziell in Ländern mit niedriger Tuberkulose-Inzidenz von Bedeutung. Wichtige Kriterien hierbei sind die Kontaktanamnese und Zugehörigkeit zu einer Risikogruppe. Eine positive Kontaktanamnese besteht, wenn Elternteile oder Bezugspersonen des Kindes an einer aktiven Tuberkulose erkrankt sind. Zu den Tuberkulose-Risikogruppen zählen Kinder mit einem Immundefekt, wie eine HIV-Infektion oder Kinder, die aus einem endemischen Land abstammen oder häufig ein Land mit hoher Tuberkulose-Inzidenz besuchen [Magdorf und Detjen, 2008]. Die Umgebungsuntersuchung erfolgt in Deutschland bei einem klinisch stabilen Kind nach einem speziellen Algorithmus. Hierbei werden immunbasierte Tests (THT und IGRA) zum Ein- oder Ausschluss einer latenten Tuberkuloseinfektion verwendet. Bei einem positiven Testergebnis erfolgt anschließend eine Röntgenaufnahme des Thorax zum Ein- oder Ausschluss einer aktiven Tuberkulose [Diel et al., 2011].

Der Gold-Standard zur Diagnose der aktiven Tuberkulose ist der kulturelle Nachweis der Mykobakterien. Zusätzlich stehen neben der Anamnese und immunbasierten Tests die Mikroskopie, NAT und bildgebende Diagnostik zur Verfügung.

Die immunbasierte Diagnostik wird unter Abschnitt 1.3.3 näher erläutert. Typische Veränderungen in der Röntgenaufnahme des Thorax ist der für nur kurze Zeit sichtbare parenchymale Rundherd (Ghon-Fokus) mit der lokalen Lymphknotenvergrößerung (Ghon-Komplex). Die Lymphknotenvergrößerung bleibt meist bestehen, wobei bei disseminierter Erkrankung die massive Lymphknotenvergrößerung zur Trachealobstruktion führen kann [Magdorf und Detjen, 2008]. Bei der postprimären Tuberkulose sind meist Kavernen in den apikalen Lungengeldern erkennbar [Burrill et al., 2007]. Bei einer komplizierten, pulmonalen Tuberkulose oder einer Miliartuberkulose kann eine Computer-

Tomographische-Abbildung weiteren Aufschluss über die Ausbreitung der Erkrankung geben. Eine tuberkulöse Meningitis kann durch Magnetresonanztomographie (MRT) als Kontrastmittelanreicherung der Meningen oder als lokale Rundherde im zentralen Nervensystem dargestellt werden [Uysal et al., 2001].

Die Probe zur kulturellen Anzucht von *M. tuberculosis* als diagnostischen Gold-Standard wird bevorzugt über induziertes Sputum oder insbesondere bei Säuglingen und Kleinkindern über Magensaftaspirate gewonnen [Zar et al., 2005]. Zur Kultivierung sowie zur Resistenztestung können auch entsprechend der Organmanifestation Liquorpunktat, Vollblut, Biopsien oder Aspirate verwendet werden. Meist werden zur Kultivierung zwei Fest- und ein Flüssigmedium verwendet, dadurch ist eine Anzucht der Mykobakterien innerhalb von 2 bis 4 Wochen möglich [Magdorf und Detjen, 2008; Schaaf und Zumla, 2009, S.169-78]. Mikroskopisch ist der Nachweis der Mykobakterien mittels der Ziehl-Neelsen- oder Fluoreszenzfärbung möglich. Durch die NAT ist ein Erregernachweis binnen weniger Tage möglich, sowie die Analyse der Art und Genotyps des Mykobakteriums [Herold, 2010]. Zur Antibiotika-Resistenzbildung kann sowohl die Kultur als auch die NAT verwendet werden [Herold, 2010]. Auf Grund der geringen Dichte und Anzahl der Erreger im respiratorischen Material (pauzibazilläre Tuberkulose) können die Mykobakterien häufig trotz aktiver Erkrankung nicht dargestellt werden [Magdorf und Detjen, 2008].

2.5 Prävention

Zur Immunisierung wird der Impfstoff Bacillus Calmette-Guérin (BCG) verwendet. Dieser enthält denaturierte, avirulente Antigene vom *Mycobacterium bovis*. Die Impfempfehlungen weltweit divergieren. In Hochprävalenz-Ländern gilt die Empfehlung, alle Neugeborenen zu impfen. In Deutschland hingegen wird eine Immunisierung seit 1998 nicht mehr empfohlen [Robert Koch-Institut, 2013].

Die BCG-Impfung scheint insbesondere vor einer Miliartuberkulose oder einer tuberkulösen Meningitis im Kindesalter zu schützen [Trunz et al., 2006].

Aufgrund von Impfkomplikationen ist die BCG-Impfung bei HIV-infizierten Säuglingen kontra-indiziert [Hesseling et al., 2008].

2.6 Therapie

Bei einer latenten Tuberkuloseinfektion wird Isoniazid für neun Monate oder eine kombinierte Chemotherapie aus Isoniazid und Rifampicin für drei bis vier Monate empfohlen [Magdorf und Detjen, 2008; Bright-Thomas et al., 2010]. Exponierte Kinder <5 Jahren mit initial negativen immunologischen Test erhalten für drei Monate eine Expositionsprophylaxe mit Isoniazid, die im Anschluss bei einem immunologischen Nachweis einer *M. tuberculosis*-Infektion gegebenenfalls als Chemoprävention auf neun Monate verlängert wird [Magdorf und Detjen, 2008].

Zur Therapie einer aktiven Tuberkulose wird, um das Entstehen von Resistenzen zu vermindern, eine kombinierte Chemotherapie über mindestens sechs Monate angewandt. Bei unkomplizierter, pulmonaler Tuberkulose ist, im Gegensatz zur Therapie bei Erwachsenen, eine dreifach Chemotherapie mit Isoniazid, Rifampicin und Pyrazinamid für zwei Monate und für weitere vier Monate eine Fortführung der Therapie mit Isoniazid und Rifampicin indiziert. Bei einer komplizierten Tuberkulose, unbekannter Sensibilität oder bei Verdacht auf eine Medikamentenresistenz wird eine vierfach Chemotherapie mit Ethambutol als viertes Antibiotikum empfohlen [Schaberg et al., 2012]. Bei Polyresistenzen stehen Aminoglykoside, Fluorchinolone und weitere sogenannte Zweitrangmedikamente zur Verfügung [Seddon et al., 2012].

3. Immunantwort und immunbasierte Diagnostik speziell im Kindesalter

3.1 Unspezifische und zelluläre Immunantwort auf *M. tuberculosis*

Die Bakterien enthaltenden Aerosole werden inhaliert und gelangen so in die respiratorischen Epithelien der unteren Atemwege. Im Alveolargewebe werden die Virulenzfaktoren der mykobakteriellen Zellwand von Toll-like Rezeptoren der Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie Makrophagen und dendritischen

Zellen, erkannt. Über immunologische Botenstoffe, die Zytokine, erfolgt die Aktivierung weiterer APC und die Phagozytose der ersten Bakterien. Nach sechs bis acht Tagen drainieren einige der dendritischen Zellen zu lokalen Lymphknoten. Dort präsentieren sie die prozessierten mykobakteriellen Antigene naiven T-Lymphozyten [Cooper, 2009]. Die Antigene werden überwiegend über den „major histocompatibility complex“ (MHC) II präsentiert. Mit Hilfe weitere Chemokine führt dies zur Aktivierung spezifischer CD4+ T-Helferzellen. Dadurch proliferieren und bilden sich überwiegend T-Helferzellen vom Typ 1 (Th-1) aus. Diese Polarisierung wird über Zytokine der APC, wie IFN- γ und Chemokine, wie IP-10, vermittelt. Die Th-1 Zellen produzieren unter anderem die Zytokine Interleukin (IL)-2, IFN- γ und „tumornecrosis-factor-alpha“ (TNF- α).

Lymphozyten, Granulozyten, Natürliche Killerzellen und Makrophagen migrieren nun, Chemokin-vermittelt, zum Entzündungsherd. Die Eliminierung der Mykobakterien erfolgt durch Apoptose von T-Lymphozyten, und Natürliche Killerzellen sowie durch Phagozytose und Lyse der Makrophagen [Schaaf und Zumla, 2009, S.75-87]. Die Bildung der kompetenten Immunantwort beansprucht ca. 18–20 Tage. In dieser Zeit können sich die Erreger ungehindert replizieren.

Gelingt keine vollständige Abtötung der Bakterien, werden diese inaktiviert und es kommt zur Ausbildung von Erreger-enthaltenden Epitheloidzell-Granulomen. Das nekrotische (verkäsende) Zentrum wird von Langerhans-Riesenzellen begrenzt. In der peripheren Zone befinden sich zelluläre Infiltrate aus Epitheloid-Zellen, dendritischen Zellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Fibroblasten. [Schaaf und Zumla, 2009, S.75-87]

Die erfolgreiche Eliminierung der Bakterien ist abhängig vom Immunsystem des Exponierten. Insbesondere Kleinkinder, HIV-Infizierte und Patienten unter immunsuppressiver Therapie (z.B. Anti-TNF- α -Therapie) haben eine verminderte Immunabwehr gegen Mykobakterien [Schaaf und Zumla, 2009, S.75-87; Cooper, 2009; Solovic et al., 2010].

3.2 Bedeutung der immunbasierten Diagnostik

Die immunbasierte Diagnostik wird insbesondere zur Diagnose der latenten Tuberkuloseinfektion angewandt. Immunbasierte Tests sind bei der Diagnose der aktiven Tuberkulose ein hinweisender Baustein, die aufgrund des erschwerten mikrobiologischen Nachweises im Kindesalter oft aus verschiedenen Faktoren wie Anamnese, bildgebenden Verfahren und immunbasierten Tests zusammengesetzt wird.

3.3 Prinzip, Verfahrensweise und diagnostische Einschränkungen immunbasierter Testverfahren

Es existieren zwei Standardverfahren zur immunologischen Diagnostik der aktiven Tuberkulose und latenten Tuberkuloseinfektion: der seit über einem Jahrhundert etablierte Tuberkulin-Hauttest und die neueren T-Zell-vermittelten IFN- γ -Release-Assays. Beide Testverfahren sind nicht zur diagnostischen Unterscheidung zwischen aktiver Tuberkulose und latenter Tuberkuloseinfektion geeignet [Chegou et al., 2009; Huebner et al., 1993].

Die B-Zell-vermittelten Testverfahren sind bisher von geringer diagnostischer Bedeutung [Steingart et al., 2011].

3.3.1 Tuberkulin-Haut-Test

Der THT wird nach dem Mendel-Mantoux-Schema angewandt [Mantoux, 1912]. Das „purified protein derivate“ (PPD) von *M. tuberculosis* wird streng intrakutan in die volare Seite des linken Unterarms injiziert. In Deutschland werden als Standarddosierung zwei Tuberkulin Einheiten des Protein-Derivates (2 TU RT23, Statens Serum Institute Copenhagen) verwendet [Magdorf und Detjen, 2008]. Das Derivat besteht aus über 200 verschiedenen Antigenen, die neben *M. tuberculosis* auch in *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium-intercellulare-Komplex* und anderen NTM vorkommen. Nach 48 bis 72 Stunden wird die transversale Induration der Injektionsstelle gemessen. Die Induration entsteht durch eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion vom Typ IV. Der Test wird in abhängig von der Größe der Induration, *M. tuberculosis*-Exposition, Immunstatus und Alter des Kindes unterschiedlich interpretiert [American Thoracic Society und Centers for Disease Control and Prevention, 2000].

Die Sensitivität und Spezifität des THT ist eingeschränkt. Insbesondere bei schweren Ausprägungen der Tuberkulose, wie Miliartuberkulose oder tuberkulöser Meningitis kann der Test falsch negativ ausfallen [Huebner et al., 1993; Mahadevan et al., 2005]. Falsch positive Testergebnisse können auf Grund von Kreuzreaktionen bei BCG-geimpften oder NTM-erkrankten Kindern auftreten. Ein falsch positiver THT bei NTM-Erkrankten ist besonders in einem Land wie Deutschland relevant, in dem die geschätzte NTM-Inzidenz im Kindesalter höher liegt als die der Tuberkulose [Haimi-Cohen et al., 2001; Farhat et al., 2006].

3.3.2 *In-vitro* Testverfahren

3.3.2.1 *T-Zell-vermittelt*

Die T-Lymphozyten sind von maßgebender Bedeutung bei der Immunabwehr gegen *M. tuberculosis*. Hierbei nimmt das von den T-Zellen, überwiegend CD4- und weniger CD8-positiven, sezernierte Zytokin IFN- γ eine Schlüsselrolle ein [Leung et al., 2009; Nikolova et al., 2013].

Das Zytokin IFN- γ aktiviert die MHC I- und II-Antigen-Präsentation, die Apoptose infizierter Makrophagen, die Induktion von Chemokinen, die Produktion der mykobakteriell-toxischen Nitritoxide und die Migration von Leukozyten zum Herd der Entzündung [Schaaf und Zumla, 2009, S.83]. Patienten mit IFN- γ - oder IL-12-Rezeptorendefekt erkranken häufiger an NTM-Erkrankungen und entwickeln vermehrt nach BCG-Immunisierung eine generalisierte BCG-Infektion [Hesseling et al., 2006; Casanova et al., 1995; van de Vosse et al., 2004; Rosenzweig und Holland, 2005]. Diese Neigung zu mykobakteriellen Erkrankung wird als „mendelian susceptibility to mycobacterial diseases“ bezeichnet [Döffinger et al., 2000].

Die in den letzten Jahren entwickelten IGRA basieren auf der direkten oder indirekten Messung von IFN- γ . *M. tuberculosis* spezifische Antigene stimulieren die spezifischen T-Zellen zur Zytokin-Freisetzung [Pai et al., 2008]. Als Antigene werden „early secreted antigenic target“ 6-kDa (ESAT-6) und „culture filtrate protein“ 10 (CFP-10) verwendet, welche in der „region of differentiation“ (RD)-1 kodiert werden. Diese Genregion ist sowohl bei allen weltweit verwendeten BCG-

Stämmen, als auch bei den meisten NTM deletiert [Mahairas et al., 1996; Pollock und Andersen, 1997; Rolinck-Werninghaus et al., 2003]. Daraus lässt sich die hohe Spezifität der IGRAs erklären.

Es existieren zwei unterschiedliche kommerziell erhältliche IGRAs, der „T-SPOT®.TB Test“ (T-Spot) (Oxford Immunotec, Abingdon, United Kingdom) ein „enzym-linked immuno-spot assay“ und der „QuantiFERON®-TB Gold in-Tube“ (QFT-IT) (Cellestis, Qiagen Company, Victoria, Australia), ein „enzyme-linked immuno sorbent assay“ (ELISA).

Für den T-Spot-Test werden aus einer Vollblutprobe, die nach Zentrifugierung sedimentierten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) isoliert. Diese werden auf eine mit Antigenen vorbeschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Die Antigen-spezifischen PBMC sezernieren IFN- γ . Die Zytokine binden sich an spezifische IFN- γ -Antikörper. Diese Antigen-Antikörper-Reaktion wird mithilfe von Enzymen als „spots“ auf der Mikrotiterplatte sichtbar [Oxford Immunotec, 2013].

Für den QFT-IT-Test werden die entnommen Vollblutproben für 48 Std. mit *M. tuberculosis*-Antigenen inkubiert. Neben ESAT-6 und CFP-10 wird zusätzlich das Protein TB 7.7 der Genomregion RD-11 eingesetzt. Die Antigen-spezifischen T-Zellen sezernieren IFN- γ . Nach der Inkubation werden nun Plasmaproben zur Durchführung des ELISAs verwendet. Die Bestimmung der IFN- γ Konzentration in IU/ml erfolgt mit Hilfe eines Spektrometers. Zur Qualitätssicherung muss eine Negativ- und Positivkontrolle durchgeführt werden.

In einigen Studien wird die Sensitivität und Spezifität der IGRA zur Diagnose der latenten Tuberkuloseinfektion über die Sensitivität und Spezifität der IGRA bei der aktiven Tuberkulose ermittelt, da ein Gold-Standard zur Diagnose der latenten Tuberkuloseinfektion fehlt [Pai et al., 2008].

Die Sensitivität und Spezifität der IGRA zur Diagnose der aktiven Tuberkulose bei **Erwachsenen** variiert je nach Tuberkulose-Inzidenz des entsprechenden Landes. Der T-Spot und QFT-IT (93% bzw. 98%) sind hochspezifische Tests zur Diagnose der aktiven Tuberkulose in Ländern mit niedriger Tuberkulose-Prävalenz [Pai et al., 2008]. Die geringere Spezifität in Ländern mit hoher

Tuberkulose-Prävalenz kann mit der hohen Prävalenz der latenten Tuberkuloseinfektion in den jeweiligen Ländern erklärt werden [Sester et al., 2011]. Die geringere Sensitivität des QFT-IT-Tests in Ländern mit hoher Tuberkulose-Prävalenz (70%) im Vergleich zu Ländern mit geringer Tuberkulose-Prävalenz ist möglicherweise mit der hohen Prävalenz an HIV-Koinfektionen und/oder Mangelernährung in den jeweiligen Ländern assoziiert [Pai et al., 2008]. Untersuchungen der IGRA bei Patienten mit HIV-Ko-Infektion lassen vermuten, dass bei einer HIV-Infektion die Sensitivität und Spezifität geringer ist [Metcalfe et al., 2011].

Ein positives Testergebnis nach Exposition mit *M. tuberculosis* scheint nicht zuverlässig die spätere Entwicklung zu einer aktiven Tuberkulose vorauszusagen [Rangaka et al., 2011].

Über die Anwendung der IGRAs im **Kindesalter** existieren derzeit wenige Daten, v.a. bei Säuglingen und Kleinkindern [Mandalakas et al., 2011].

Die Sensitivität des QFT-IT- und T-Spot-Tests zur Diagnose der aktiven Tuberkulose sind ähnlich (83% bzw. 84%) [Mandalakas et al., 2011]. Die Sensitivität des QFT-IT- (86%) und des T-Spot-Tests (86%) in Ländern mit geringer Tuberkulose-Inzidenz scheint, ähnlich wie bei den Erwachsenen, höher zu sein als in Ländern mit hoher Tuberkulose-Inzidenz (QFT-IT 58% und T-Spot 77%). Beim Vergleich der IGRA- und THT-Ergebnisse zur Diagnose der aktiven Tuberkulose und latenten Tuberkuloseinfektion wurde festgestellt, dass die IGRAs dem THT nicht überlegen sind [Mandalakas et al., 2011; Kampmann et al., 2009; Sun et al., 2011; Machingaidze et al., 2011].

Die Spezifität der IGRAs zur Diagnose der aktiven Tuberkulose und latenten Tuberkuloseinfektion ist im Kindesalter, unabhängig vom BCG-Impfstatus, sehr hoch, für den QFT-IT-Test 91% und für den T-Spot-Test 94% [Mandalakas et al., 2011]. Der IGRA kann bei positivem THT zur Unterscheidung einer Tuberkulose von einer NTM-Erkrankung hilfreich sein [Detjen et al., 2007].

Neben der nicht zufriedenstellenden Sensitivität, ist als weitere diagnostische Einschränkung der IGRA im Kindesalter die erhöhte Rate an nicht interpretierbaren Testergebnissen auf Grund von unzureichender IFN- γ -Konzentration bei den Positiv-Kontrollen zu erwähnen. Dies gilt insbesondere

für Patienten mit Immunsuppression und/oder Kleinkinder unter fünf Jahren [Hausstein et al., 2009; Connel et al., 2010; Mandalakas et al., 2011].

3.3.2.2 B-Zell-vermittelt

Derzeit ist die serologische Bestimmung spezifischer Antikörper unzureichend sensitiv (0%-100%) und spezifisch (58%-100%), um zur Diagnose der aktiven Tuberkulose verwendet zu werden [Steingart et al., 2011].

3.4 Neue Biomarker

Die IGRA für die Diagnose der Tuberkulose im Kindesalter verfügen nur über eine suboptimale Sensitivität und es kommt vermehrt zum Auftreten von nicht-interpretierbaren Testergebnissen. Darüberhinaus ist mittels der IGRA keine Unterscheidung zwischen latenter Tuberkuloseinfektion und aktiver Tuberkulose möglich. Aus diesen Gründen werden alternative Biomarker insbesondere für die Tuberkulose-Diagnostik im Kindesalter benötigt.

Häufig wurden die Biomarker aus QFT-IT-Überständen bestimmt, welche zuvor mit den *M. tuberculosis* spezifischen Antigenen ESAT-6, CFP-10 und TB7.7, stimulierten wurden.

Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Konzentrationen von „epidermal growth factor“ und „macrophage inflammatory protein“-1- β in Seren von Tuberkulose-Patienten und latent Tuberkulose-Infizierten erhöht waren und diese Biomarker in Kombination mit weiteren spezifischen Proteinen eine Unterscheidung zwischen Tuberkulose und latenter Tuberkuloseinfektion ermöglichen könnten [Chegou et al., 2009].

Ruhwald et al. bestimmten die „IFN- γ inducible protein“ (IP)-10- und Interleukin (IL)-2-Konzentrationen in *M. tuberculosis*-Exponierten oder *M. tuberculosis* infizierten Kindern in Nigeria. Nach Plasmastimulation mit *M. tuberculosis*-spezifischen Antigenen waren die IP-10- und IL-2-Konzentrationen deutlich erhöht [Ruhwald, Petersen et al., 2008].

2008 testeten Ruhwald et al. erneut die IP-10- und „monocyte chemotactic protein“-2-Konzentrationen in Plasmen Tuberkulose-Erkrankter, die ein positives Kultur- oder PCR-Ergebnis zeigten, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, die nicht mit *M. tuberculosis* exponiert waren. Auch hierbei wurde festgestellt, dass die Plasmaspiegel beider Biomarker in der Gruppe der

Tuberkulose-Erkrankten deutlich im Vergleich zu den nicht Erkrankten erhöht waren. [Ruhwald, Bodmer et al., 2008].

4. *Stand der Forschung: Chemokin IP-10 als Biomarker bei Tuberkulose*

Nach Stimulation mit spezifischen Antigenen wurde IP-10 in deutlich höheren Konzentrationen sezerniert als andere untersuchte Biomarker. Aus diesem Grund konzentrierten sich weitere experimentelle Untersuchungen auf das Chemokin IP-10 [Ruhwald et al., 2007; Ruhwald, Petersen et al., 2008; Ruhwald, Bodmer et al., 2008].

4.1 IP-10 als Chemokin

Chemokine sind Zytokine mit überwiegend chemotaktischer Funktion. Sie sind Polypeptide, deren Größe wenige Kilo-Dalton betragen. Die meisten Chemokine können an verschiedenen Rezeptoren unterschiedlicher Zellen andocken. Es werden insbesondere zwei große Unterfamilien der Chemokine anhand der jeweiligen Proteinstruktur unterschieden, die CC- und die CXC-Chemokine. In der Gruppe der CC-Chemokine liegen die ersten beiden Cysteine direkt benachbart, wobei in der Gruppe der CXC-Chemokinen die ersten beiden Cysteine durch einen Aminosäurerest getrennt werden [Murphy et al., 2008, S.83-9; Zlotnik und Yoshie, 2000].

Von besonderer Bedeutung bei der immunologischen Reaktion gegen *M. tuberculosis* scheint das Chemokin CXCL10 der CXC-Unterfamilie zu sein. Das Chemokin CXCL10 wird auch als IFN- γ inducible protein 10 (IP-10) bezeichnet und wird von Keratinozyten, Fibroblasten, Makrophagen, T-Zellen und dem Endothel gebildet [Ruhwald und Ravn, 2009; Murphy et al., 2008, S.83-9]. Es wird insbesondere bei chronisch-infektiösen und proliferativen Prozessen vermehrt sezerniert [Oppenheim et al., 1991].

IP-10 bindet an CXCR3, einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Im Rahmen der Immunreaktion gegen *M. tuberculosis* führt die Rezeptor-Liganden-Bindung zur Aktivierung von T-Zellen, Natürlichen Killerzellen und Monozyten und zur chemotaktischen Migration der jeweiligen Zelle zum Entzündungsherd. Darüber

hinaus wird die Ausreifung und Polarisierung zu Th-1-Zellen aktiviert [Ruhwald und Ravn, 2009; Murphy et al., 2008, S.83-9; Lighter et al., 2009].

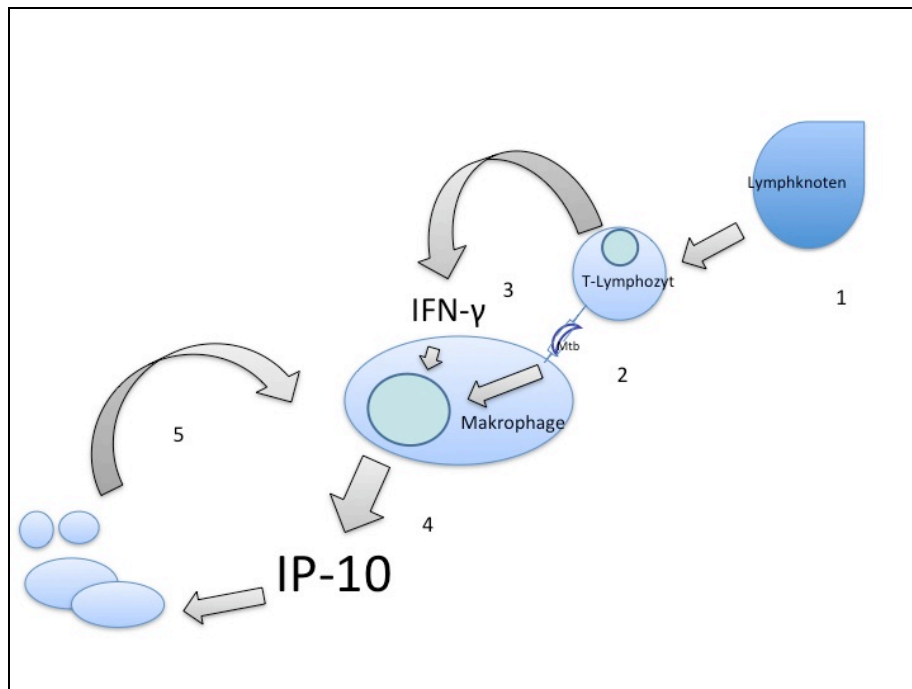


Abbildung 2 zeigt die pathophysiologische Interaktion von IP-10 und IFN-γ. (Die Abbildung wurde freundlicherweise von M.Ruhwald zur Verfügung gestellt)

4.2 IP-10 als Biomarker

Bereits 1987 konnte gezeigt werden, dass nach dermalen Injektion von PPD, IP-10 vermehrt in Makrophagen, Keratinozyten und Endothelzellen gebildet wird [Kaplan et al., 1987].

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die IFN- γ - mit der IP-10-Genexpression korreliert. IFN- γ ist in der Lage, die Transkription von IP-10 in Makrophagen und anderen APC zu aktivieren. Daher stammt der Name des Proteins: 'IFN- γ inducible protein 10' (siehe Abbildung 2) [Luster und Revetch, 1987; Kaplan et al., 1987; Rhoades et al., 1995].

Zur Formierung der Epitheloidgranulome sind Leukozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten notwendig, die durch Chemokine zum Entzündungsort

gelockt werden. Diese Chemokine wurden im Rahmen der Erforschung neuer Tuberkulose-Diagnostik untersucht. Juffermans et al. stellten fest, dass die IP-10 Konzentrationen im Blutplasma Tuberkulose-Erkrankter und bei Personen mit Tuberkulose-Haushaltskontakt im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöht waren [Juffermans et al., 1999].

In den folgenden Jahren wurde die Untersuchung des Chemokins IP-10 zur Diagnose der aktiven und latenten Tuberkuloseinfektion intensiviert.

Die Sensitivität und Spezifität des IP-10-Tests bei Patienten mit aktiver Tuberkulose scheint, ähnlich wie bei den IGRAs, je nach epidemiologischem Hintergrund des Patienten zu variieren. In Ländern mit niedriger Tuberkulose-Prävalenz wurde eine Sensitivität von 81% bis 83% und eine Spezifität von 97% ermittelt [Ruhwald, Bodmer et al., 2008; Ruhwald et al., 2011]. In Ländern mit hoher Tuberkulose-Prävalenz hingegen konnte eine Sensitivität von 92,5% und eine Spezifität von 48% berechnet werden. Die geringe Spezifität könnte mit der hohen Prävalenz der latenten Tuberkuloseinfektion erklärt werden [Kabeer et al., 2010]. Beim Vergleich des QFT-IT- mit dem IP-10-Test konnte eine hohe Konkordanz der Testergebnisse festgestellt werden [Ruhwald et al. 2011, Rohwald, Bodmer et al., 2008]. Der IP-10-Test fiel allerdings häufiger positiv aus. Dies könnte entweder mit einer höheren Sensitivität oder mit einer geringeren Spezifität von IP-10 im Vergleich zu IFN- γ erklärt werden [Ruhwald et al., 2011]. Die IP-10-Sekretion scheint nur geringfügig von einem supprimierten Immunsystem, wie bei HIV-Infizierten, beeinflusst zu sein [Goletti et al., 2010; Aabye et al., 2010].

Eine Zunahme der Sensitivität bei gleichbleibend hoher Spezifität wurde bei Kombination des QFT-IT- und IP-10-Tests festgestellt [Ruhwald, Bodmer et al., 2008; Kabeer et al., 2010; Ruhwald et al., 2011].

4.2.1 IP-10 als Biomarker bei nicht-tuberkulösen Erkrankungen

IP-10 ist neben immunologischen Reaktionen auf *M. tuberculosis* auch bei chronisch-entzündlichen Prozessen und Tumorstadium beteiligt [Verbeke et al., 2012; Vandercappellen et al., 2008]. Bei letzterem bewirkt IP-10 eine Angiostase und fördert die Freisetzung von anti-tumoralen Lymphozyten [Yates-Binder et al., 2012]. Vor und während der Therapie von Patienten mit

chronischer Hepatitis C-Infektionen können IP-10-Konzentrationsspiegel als Prognosemarker bestimmt werden [Larrubia et al., 2008; Lagging et al., 2011]. Ebenso scheint IP-10 bei fortgeschrittener Leberzirrhose erhöht zu sein [Anderson et al., 2011]. Möglicherweise kann IP-10 als Biomarker bei rheumatischen Nierenerkrankungen im Kindesalter Verwendung finden [Das und Brunner, 2009].

4.3 IP-10 und Kindertuberkulose

IP-10 scheint auch zur Diagnostik der aktiven Tuberkulose oder latenter Tuberkuloseinfektion im Kleinkindes- und Kindesalter Verwendung zu finden [Lighter et al., 2009; Whittaker et al., 2008; Petrucci et al., 2008; Ruhwald, Peterson et al., 2008]. Einige Studien zeigten, dass IP-10 im Gegensatz zu IFN- γ weniger durch ein unreifes Immunsystem von Säuglingen und Kleinkindern beeinflusst zu sein scheint [Lighter et al., 2009; Bergamini et al., 2009; Mandalakas et al., 2011; Connel et al., 2010; Hausstein et al., 2009].

Allerdings existieren bisher nur sehr wenige Daten zu IP-10 im Kindesalter. Auch steht offen, ob mittels IP-10-Bestimmung eine Unterscheidung von Tuberkulose-erkrankten oder latent Tuberkulose-infizierten Kindern und Kindern mit NTM-Erkrankung möglich ist.

2. Ziele der Arbeit

1. Hauptziel

Die diagnostischen Mittel zur Diagnose der aktiven Tuberkulose und latenten Tuberkuloseinfektion im Kindesalter sind nicht zufriedenstellend. Daher werden neue Methoden zur Tuberkulose- und latenten Tuberkuloseinfektions-Diagnostik benötigt. In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde untersucht, ob der neue Biomarker IP-10 zur Diagnose der Tuberkulose und latenten Tuberkuloseinfektion im Kindesalter Verwendung finden kann.

2. Einzelziele

1. Bestimmung der IP-10-Plasmakonzentrationen nach Stimulation mit *M. tuberculosis*-spezifischen Antigenen bei Kindern mit Tuberkulose (TB), latenter Tuberkuloseinfektion (LTBI), Erkrankung mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM) oder Atemwegsinfektion (AWI).
2. Beurteilung, ob eine diagnostische Unterscheidung von TB und LTBI mittels IP-10-Plasmakonzentration bei Kindern möglich ist.
3. Vergleich des neuen IP-10-basierten Testverfahrens mit einem bereits etablierten IFN- γ -basiertem Testverfahren hinsichtlich der Diagnostik der TB und LTBI im Kindesalter.
4. Untersuchung, inwieweit die IP-10-Plasmakonzentration bei Kindern mit TB, LTBI, NTM-Erkrankung oder AWI nach unspezifischer Mitogen-Stimulation mit dem Alter des Kindes korreliert.

3. Methoden

1. Studiendesign

1.1 Art der Studie

Es wurde eine Fall-Kontroll-Studie mit prospektivem experimentellen Studienanteil durchgeführt.

1.2 Auswahl der Studienteilnehmer

Von Januar 2008 bis Juli 2009 wurden alle von der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie der Charité-Universitätsmedizin und des HELIOS Klinikums Emil von Behring angeforderten QFT-IT-Tests im Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Laboratoriumsmedizin des zuletzt genannten Klinikums durchgeführt. Die jeweiligen Testergebnisse wurden in einer speziellen QFT-IT-Test-Datenbank gespeichert. Alle Studienteilnehmer wurden über diese Datenbank ausgewählt.

Einen QFT-IT-Test erhielten alle Kinder, bei denen auf Grund einer Atemwegsinfektion und/oder Lymphadenopathie eine Tuberkulose differentialdiagnostisch ausgeschlossen bzw. diagnostiziert wurde. Auch Kinder mit positiver Risikoanamnese erhielten zum Aus- oder Einschluss einer latenten Tuberkuloseinfektion einen QFT-IT-Test.

Die Fallzahl wurde mittels nQuery Advisor 7.0 von Dr. rer. nat. Neumann, Mitarbeiter des Instituts für Biometrie und Epidemiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, berechnet. Es wurde eine minimale Fallzahl von $n=11$ pro Gruppe ermittelt.

Es wurden alle Kinder in die Studie eingeschlossen, die zum Zeitpunkt des für die Studie verwendeten QFT-IT-Testes nicht älter als fünf Jahre waren und deren QFT-IT-Testergebnisse beurteilbar waren. In den Gruppen, in denen keine minimale Fallzahl von 11 Teilnehmern erreicht wurde, erweiterten wir das Alter

als Einschlusskriterium auf nicht älter als 8 Jahre, trotzdem konnte in der NTM-Gruppe keine minimale Fallzahl von 11 Teilnehmern erreicht werden.

1.2.1 Einteilung der Studiengruppen

Alle Studienteilnehmer wurden entweder in die Gruppe der aktiven Tuberkulose (TB), der latenten Tuberkuloseinfektion (LTBI), der nicht tuberkulösen Mykobakteriose (NTM) oder der Atemwegsinfektion (AWI) eingeteilt. Zur Fall-Gruppe zählten die TB- und LTBI-Gruppe und diese wurde als *M. tuberculosis* Infizierte bezeichnet. Zur Kontroll-Gruppe zählte die NTM- und AWI-Gruppe und diese wurden als nicht *M. tuberculosis*-Exponierte bezeichnet.

1.2.1.1 TB

In die TB-Gruppe wurden (n = 11) Kinder mit pulmonaler und extrapulmonaler Tuberkulose eingeschlossen bei denen eine positive *M. tuberculosis*-Kultur nachgewiesen werden konnte, die zusätzlich oder stattdessen in bildgebenden Verfahren TB-spezifische Zeichen aufwiesen (siehe Diagnostik, 1.2.4). Hinzukommend litten alle Kinder unter mindestens zwei der TB-spezifischen Symptome, wie Husten, Nachtschweiß, Abgeschlagenheit und Fieber.

1.2.1.2 LTBI

In die LTBI-Gruppe wurden (n = 14) Kinder eingeteilt: die einen dokumentierten positiven Kontakt zu einer an TB-erkrankten Index-Person hatten, einen positiven THT und/oder einen positiven IGRA-Test. Keines der zugeordneten Kinder litt unter TB-spezifischen Symptomen und kein bildgebendes Verfahren zeigte TB-spezifische Veränderungen (siehe 1.2.4.).

1.2.1.3 NTM

Der NTM-Gruppe wurden (n = 8) Kinder zugeteilt, die symptomatisch unter einer zwei Wochen Antibiotika-Therapie resistenten, cervikalen Lymphadenopathie litten und aus deren exzidierten Lymphknoten kulturell NTM nachgewiesen wurden und/oder histologisch eine Epitheloidzellgranulomatose festgestellt werden konnte. Für kein Kind der NTM-Gruppe wurde eine positive Kontaktanamnese zu einem TB-Patienten dokumentiert. Bei einem positiven

THT-Ergebnis wurde ebenso ein IGRA-Test durchgeführt und nur bei negativem IGRA-Testergebnis wurde das Kind in die NTM-Gruppe eingeschlossen.

1.2.1.4 AWI

In die AWI-Gruppe wurden (n = 15) Kinder eingeteilt, die unter lang andauernden respiratorischen Infektionen litten. Keines der Kinder hatte einen dokumentierten Kontakt zu einem TB-Patienten. Die THT- und IGRA-Testergebnisse waren stets negativ.

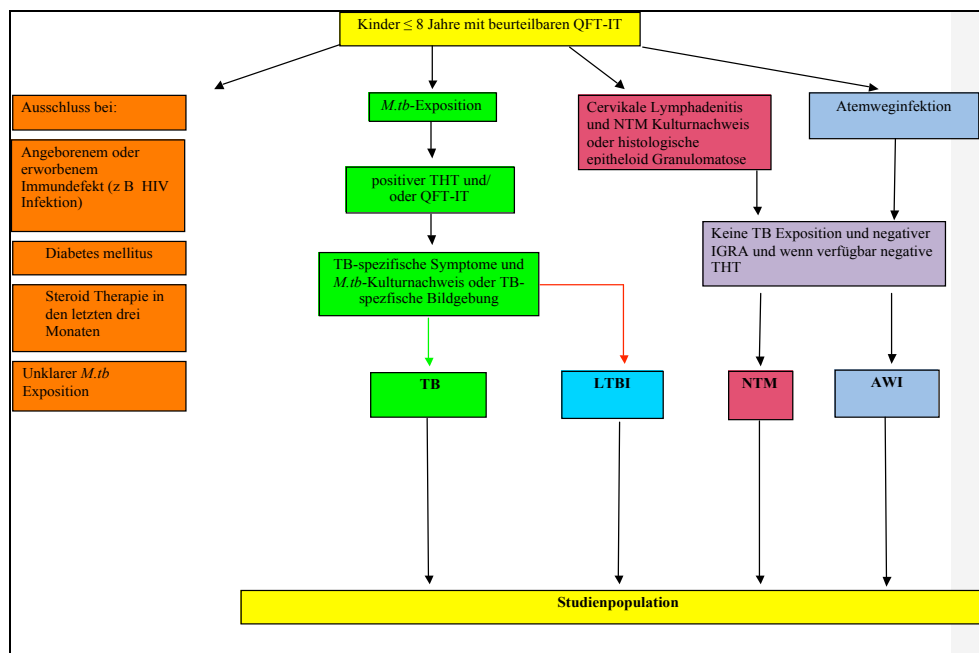


Abbildung 3 zeigt schematisch die Zusammensetzung der Studienpopulation und die Unterteilung in die vier Studiengruppen.

1.2.2 Ausschlusskriterien

Aus der Studie ausgeschlossen wurden diejenigen Kinder, die entweder unter einer oder mehreren der folgenden Erkrankungen litten: einem angeborenem oder erworbenen Immundefekt, wie einer HIV-Infektion, einem Diabetes mellitus und/oder einer in den letzten drei Monaten mit Steroiden

behandlungsbedürftigen Erkrankung. Ebenso wurden diejenigen Kinder aus der Studie ausgeschlossen, bei denen keine eindeutige TB-Exposition ein- oder auszuschließen war und/oder eine eindeutige Zuordnung in TB-, LTBI-, NTM- oder AWI-Gruppe nicht möglich war. Abbildung 3 zeigt schematisch die Zusammensetzung der Studienpopulation und die Unterteilung der einzelnen Gruppen.

2. Datenerhebung und -verwaltung

Die personenspezifischen Daten zu den quantitativen QFT-IT-Testergebnissen, mykobakterielle Kultur-, Mikroskopie- und PCR-Befunde wurden über die Datenbank des Instituts für Mikrobiologie, Immunologie und Laboratoriumsmedizin am HELIOS Klinikums Emil von Behring gewonnen.

Daten zur Kontaktanamnese (Kontakt zu einem TB-Indexfall oder Aufenthalt in einem Land mit hoher TB-Prävalenz), Symptomen (z.B. Husten, Nachtschweiß und Abgeschlagenheit), THT-Ergebnisse und gegebenenfalls Röntgenthorax-Aufnahmen wurden den QFT-IT-Anforderungsbögen entnommen. Die Anforderungsbögen enthielten außerdem demographische Informationen zur Testperson und weitere Erläuterungen die eine Notwendigkeit des QFT-IT-Testes erklärten.

Zur Komplettierung der erforderlichen medizinischen Daten der Studienteilnehmer wurden Arztbriefe des jeweiligen Patienten herangezogen. Arztbriefe von Patienten der Pädiatrischen Abteilung des HELIOS Klinikums Emil von Behring wurden elektronisch über das Patientendokumentationsprogramm archiviert. Die Arztbriefe enthielten Akten von Patienten der Abteilung Pädiatrie mit Schwerpunkt Immunologie und Pneumologie der Charité wurden aus dem Zentral-Archiv der Charité entnommen.

Zur systematischen Datenerfassung wurde ein „case report form“ erstellt. Als biographische Daten wurde der Familienname, Vornamen und Geburtsdatum erhoben. Außerdem wurde das Alter des Kindes zum Zeitpunkt des zum experimentellen Studienanteil verwendeten QFT-IT-Testes notiert. Folgende medizinische Daten wurde erfasst: die Kontaktanamnese, Datum und Induration der maximal letzten drei THT-Teste, Datum und Ergebnisse der maximal letzten drei QFT-IT-Teste, wenn erhältlich auch Ergebnisse der T-Spot-Tests,

radiologische Befunde (Röntgenthorax oder MRT-Aufnahmen), histologische Befunde, mykobakteriologischer PCR-, Mikroskopie- und/oder Kultur-Nachweis. Außerdem wurde die Ausprägung der TB und falls vorhanden, negative Mitogen-Kontrollen sowie Nebenerkrankungen vermerkt. Die unten abgebildete Tabelle 1 stellt das verwendeten „case report form“ exemplarisch dar.

Nr.	Vorname	Nachname	Geburtsdatum	Alter	TB-Kontakt	1. THT	2. THT	3. THT	1. IGRA	2. IGRA	3. IGRA	Symptome	Radiologische Befunde	1. Kultur/ PCR	2. Ku tur/ PCR	3. Kultur/ PCR	Kommentar

Tabelle 1. „case report form“

3. Experimenteller Studienanteil: IP-10-Bestimmung

3.1 Probengewinnung

Zur IP-10-Bestimmung wurden die Plasmaüberstände des QFT-IT-Testes verwendet.

Die Durchführung des QFT-IT-Testes erfolgte entsprechend des Gebrauchshinweises des Herstellers [QuantiFeron®-TB Gold (In-Tube-Method), Package Insert For *In Vitro* Diagnostic Use]. Jedem Patienten wurden 3 ml venöses Blut entnommen und in weniger als 16 h zum Labor transportiert. Je 1 ml Vollblut wurde in drei maschinell vorbeschichtete Röhrchen pipettiert. Das erste Röhrchen (= Antigen stimulierte Probe) war mit den TB-spezifischen-Antigenen ESAT-6, CFP-10 und TB7.7. beschichtet (siehe auch 1.3.3). Das zweite Röhrchen (= Mitogen-stimulierte Probe) enthielt die Positiv-Kontrolle. Es war somit mit der mitogenen Substanz Phythemagglutinin [Geha und Merler, 1974] beschichtet und das dritte Röhrchen (unstimulierte Probe oder Null) war als Negativ-Kontrolle unbeschichtet und enthielt daher das unstimulierte venöse Blut. Nach dem Verteilen des Vollblutes auf die drei Röhrchen erfolgte die Inkubation der Proben für 16 h bis 24 h und die Zentrifugation zur Gewinnung von Plasmaüberständen. Aus diesen Proben wurden 100 µl abpipettiert und zur Durchführung der weiteren Arbeitsschritte des QFT-IT-Testes verwendet. Die

nicht weiter benötigten QFT-IT-Plasmaüberstände wurden in unbeschichtete 5 ml Tuben umgefüllt und mit einer Testnummer sowie dem Namen des Patienten versehen. Die Asservate wurden bei -20 °C in einer Gefriertruhe des Instituts für Mikrobiologie, Immunologie und Laboratoriumsmedizin am HELIOS Klinikums Emil von Behring aufbewahrt.

Antigen-stimulierte Proben nach Subtraktion des unstimulierten Wertes mit einer IFN- γ Konzentration $\geq 0,35$ UI/ml (= 17,5 pg/ml) galten als positiv. Das Testergebnis wurde als nicht auswertbar betrachtet, wenn die Mitogen-Kontrolle nach Subtraktion des unstimulierten Wertes $< 0,5$ IU/ml (= 25 pg/ml) und/oder die nicht stimulierte Negativ-Kontrolle $> 8,0$ UI/ml (= 400 pg/ml) lag [QuantiFeron®-TB Gold (In-Tube-Method), Package Insert For *In Vitro* Diagnostic Use].

3.2 Probentransport

Die Asservate wurden zum Transport in einer Box gelagert, die mit 23 kg Trockeneis, bestehend aus schockgefrostenem Kohlendioxid („Ice-clou“, YARA Industrial GmbH, Deutschland), gefüllt war. Somit konnte gewährleistet werden, dass die Proben für mindestens drei Tage bei -80 °C gefroren blieben. Die Plasmaüberstände wurden binnen 20 h zum Klinischen Forschungszentrum der Universität von Kopenhagen ins Hvidovre Hospital in Hvidovre, Dänemark, transportiert.

Vor Ort wurden die Proben nach Vornamen sortiert, so dass jeder Antigen-stimulierten Plasmaprobe die zugehörige Mitogen-stimulierte und unstimulierte Probe zugeordnet werden konnte. Diese wurde dann zur Erwärmung auf Raumtemperatur zentrifugiert.

3.3 IP-10-ELISAs

3.3.1 Materialliste

Folgende Materialien wurden für den gesamten ELISA verwendet:

- a) 96-Well-Mikrotiterplatte x (Nunc MaxiSorp®, Roskilde, Dänemark)
- b) Waschpufferlösung aus „phosphat-buffered saline“ (PBS), pH 7,4 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) und 0,1 % Tween-20 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA)

- c) Blockpuffer, StableGuard (Pierce, Rockford, US)
- d) Inkubator (Thermo Fisher Scientific Inc.®, Ashville, US)
- e) Vortex (USA Scientific®, Orlando, USA)

Folgende Materialien wurden für die Vorbeschichtung verwendet:

- a) Carbonatpuffer 9,6 pH (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA)
- b) Monoklonal hergestellte IP-10-Antikörper aus Mäusen (hauseigene Herstellung des Klinischen Forschungszentrums der Universität von Kopenhagen, Hvidovre Hospital, Hvidovre, Dänemark)

Folgende Materialien wurden zur Herstellung des Standards verwendet:

- a) Humane, unkonjugierte IP-10-Stocklösung (PeproTech®, Rocky Hill, USA)
- b) Verdünnungslösung aus 2 % „bovine-serum-albumin“ (BSA) (Roche, Schweiz), in PBS pH 7,4 (Sigma-Aldrich®, St. Luis, USA) und 0,1 % Tween-20 (Sigma-Aldrich®, St. Luis, USA)
- c) Nicht absorbierbare 96-Well-Mikrotiterplatte (NUNC® Platte, Roskilde, Dänemark)

Folgende Materialien wurden zur IP-10-Detektion verwendet:

- a) Biotinylierte anti-human IP-10-Antikörper aus Ratten (hauseigene Herstellung des Klinischen Forschungszentrums der Universität von Kopenhagen, Hvidovre Hospital, Hvidovre, Dänemark)
- b) Streptavidin-„horseradish peroxidase“ (HRP) (BD Pharmingen™, Franklin Lakes, USA)
- c) 1M H₂SO₄ (Klinisches Forschungszentrum der Universität von Kopenhagen, Hvidovre Hospital, Hvidovre, Dänemark)
- d) ELISA-Spektrophotometer (ELX50, BioTek®, Winooski, USA)

3.3.2 Durchführung

3.3.2.1 Vorbeschichtung der Messplatten

Bereits vor Ankunft der Proben wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten vorbeschichtet. Jeder Vertiefung wurde 100 µl 0,05 M Carbonatpuffer und 0,3 µg monoklonal hergestelltes IP-10-Antigen hinzugefügt. Die Platte wurde abgedeckt und über Nacht bei 2-8 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit 300 µl/Vertiefung Waschpuffer gewaschen. Nach jedem Waschzyklus wurde die Platte trocken geklopft. Das Ziel des Waschens war, ungebundene Restreagenzien aus den Vertiefungen zu entfernen. Anschließend wurden 150 µl Blockpuffer pro Vertiefung hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde abgedeckt und erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte erneut fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und nach jedem Waschzyklus trocken geklopft.

3.3.2.2 Herstellung des Standards

Für jede der 96-Well-Mikrotiterplatten wurde jeweils ein individueller Standard hergestellt.

Zur Herstellung des jeweiligen Standards gab man 100 µl in ein Eppendorf-Röhrchen. Diese IP-10-Stocklösung enthielt 4000 pg IP-10, welche in 1900 µl Lösung verdünnt wurde. Der erste Standard wurde somit 1:20 verdünnt. Der Inhalt des Gefäßes wurde durch dreimaliges Resuspendieren gemischt. Die weiteren Verdünnungen wurden ausgehend vom ersten Standard jeweils 1:2 verdünnt. Auf je 500 µl Verdünnungslösung wurde jeweils 500 µl Standard pipettiert, bis hin zu einer IP-10 Konzentration von 62,5 pg/ml. Daraus ergaben sich folgende Standardkonzentrationen: der erste Standard enthielt 4000 pg/ml, der zweite 2000 pg/ml, der dritte 1000 pg/ml, der vierte 500 pg/ml, der fünfte 250 pg/ml, der sechste 125 pg/ml und der letzte und siebte Standard enthielt 62,5 pg/ml IP-10 Antigen Lösung.

3.3.2.3 Probenverdünnung

Aus den drei Plasmaproben jedes Studienteilnehmers wurden jeweils 25 µl entnommen und auf eine nicht absorbierende Mischwellplatte übertragen. Anschließend wurden die Proben 1:10 mit 225 µl Verdünnungspuffer verdünnt. Der Inhalt der Vertiefungen wurde durch dreimaliges Resuspendieren gemischt.

3.3.2.4 Nachweis von IP-10

Sowohl die Standards als auch die Plasmaproben wurden in einer Doppelbestimmung untersucht. 250 µl des Standards wurden in die jeweilige vorbeschichtete Vertiefung pipettiert. Von der Titerplatte wurden 100 µl der

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Blank	Blank	negativ	negative	Sample 8	Sample 8	Sample 16	Sample 16	Sample 24	Sample 24	Sample 32	Sample 32
Std A	Std A	antigen	antigen	Sample 9	Sample 9	Sample 17	Sample 17	Sample 25	Sample 25	Sample 33	Sample 33
Std B	Std B	positiv	positiv	Sample 10	Sample 10	Sample 18	Sample 18	Sample 26	Sample 26	Sample 34	Sample 34
Std C	Std C	Sample 3	Sample 3	Sample 11	Sample 11	Sample 19	Sample 19	Sample 27	Sample 27	Sample 35	Sample 35
Std D	Std D	Sample 4	Sample 4	Sample 12	Sample 12	Sample 20	Sample 20	Sample 28	Sample 28	Sample 36	Sample 36
Std E	Std E	Sample 5	Sample 5	Sample 13	Sample 13	Sample 21	Sample 21	Sample 29	Sample 29	Sample 37	Sample 37
Std F	Std F	Sample 6	Sample 6	Sample 14	Sample 14	Sample 22	Sample 22	Sample 30	Sample 30	Sample 38	Sample 38
Std G	Std G	Sample 7	Sample 7	Sample 15	Sample 15	Sample 23	Sample 23	Sample 31	Sample 31	Sample 39	Sample 39

Abbildung 4 stellt exemplarisch die schematische Beschickung der Mikrotiterplatte dar. Std = Standard.

Probenlösung mittels einer Multikanalpipette aus jeder Vertiefung pipettiert und auf die mit IP-10-Antikörpern vorbeschichtete Titerplatte übertragen. Die Titerplatte mit Standards und Proben wurde mit einer Folie abgedeckt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Platten dreimal gewaschen. Zur Beschickung der Mikrotiterplatten wurden die ersten zwei horizontalen Felder mit Waschpufferlösung gefüllt. In den zwei ersten Spalten wurde somit der Standard in absteigender Stärke verdünnt. Von der 3. bis zur letzten 12. Spalte befanden sich die Plasmaproben. Wie für die erste Probe dargestellt, wurde jeweils in die zwei nebeneinander liegenden Vertiefungen der nächsten zwei Spalten die Negativ-Kontrolle eingefüllt, in die darunterliegenden

Vertiefungen die Antigen-stimulierte Probe und zuletzt die Mitogen-stimulierte Positiv-Kontrolle. Diese Anleitung zur Beschickung der Mikrotiterwellplatten wurde identisch für alle Platten verwendet (siehe Abbildung 4).

Zur Detektierung von IP-10 wurde ein IP-10-Antikörper verwendet (siehe Materialliste). Dieser wurde 1:4000 mit Streptavidin-HRP verdünnt. Somit enthielt die IP-10-Antikörper enthaltene Lösung 0,125 µl IP-10 Antikörper in 499,875 µl Verdünnungslösung. In einem weiteren Verdünnungsschritt wurden 3,2 µl von dieser Lösung abpipettiert und in 12 ml Verdünnungslösung gegeben. Nun wurde jeweils 100 µl dieser verdünnten Lösung in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben. Alle Platten wurden mit einer Folie abgedeckt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Platten erneut dreimal gewaschen. Nun wurde jedem Well 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat hinzugegeben. Darauf folgte eine lichtgeschützte Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Durch die Hinzugabe von 100 µl/Vertiefung einer 1 M Schwefelwassersäure wurde die Farbreaktion gestoppt. Die optische Dichte der Vertiefungen wurde mittels einem ELISA- Spektrophotometer bei 450 nm gemessen. Die IP-10-Konzentration der Plasmaproben konnte jetzt anhand der Standardkurve errechnet werden. Die Abbildung 5 zeigt die Standardkurve der ersten gemessenen Mikrotiterplatte.

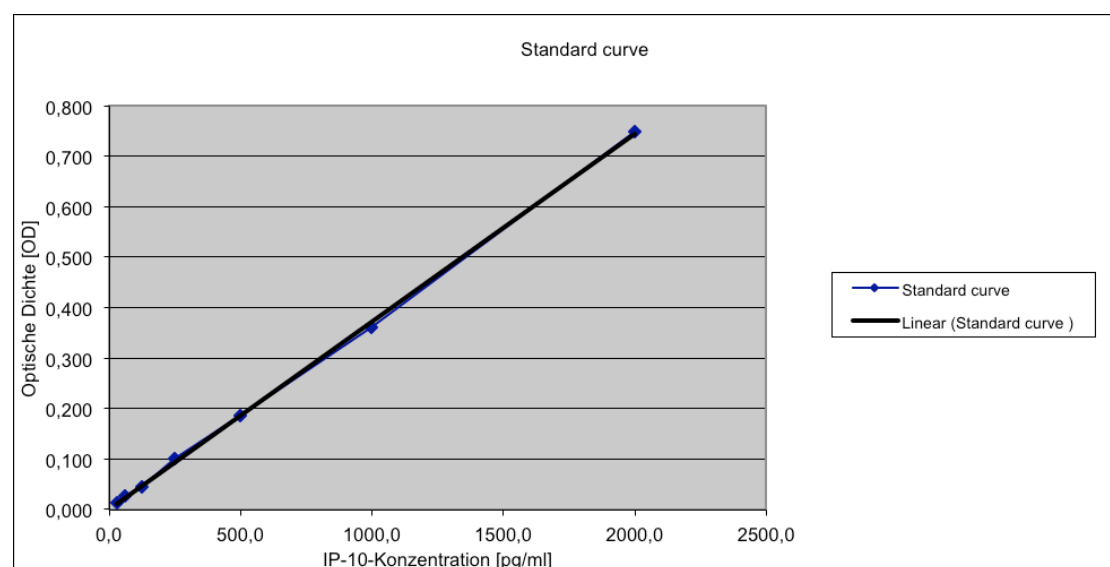


Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Standardkurve (in blau) der ersten gemessenen Mikrotiterplatte.

4. Datenverwaltung

Die Daten wurden digital in Excel-Tabellen gespeichert.

5. Datenanalyse

Zur Auswertung wurde jeweils der Mittelwert der doppelt bestimmten IP-10-Werte festgelegt, geltend für alle Proben und die Standards.

Um die rein durch die TB-spezifischen Antigene bzw. Mitogen-stimulierten IP-10-Werte zu erhalten, wurde von allen gemessenen Antigen-stimulierten Werten die Werte der jeweiligen unstimulierten Negativ-Kontrolle subtrahiert.

Zur Beurteilung eines binären Testergebnisses wurde nach Lighter et al. der „cut-off“ für ein positives Testergebnis bei einer IP-10-Konzentration von 982 pg/ml festgelegt [Lighter et al., 2009].

Die Werte wurden mit dem statistischen Analyse-Programm „GraphPad Prism“, Version 4 (GraphPad Prism Software, California, USA) ausgewertet.

Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als signifikant und ein p -Wert $< 0,001$ als hoch signifikant angesehen.

5.1 IP-10-Konzentrationen in den drei Stimulationsmodi

Die gemessenen IP-10-Werte in den drei unterschiedlichen Stimulationsmodi pro Gruppe wurden deskriptiv aufgeführt. Zur Beschreibung der zentralen Tendenz wurde der Median verwendet. Die Dispersion der Werte wurde durch den Minimal- und Maximalwert und die 25%- und 75%-Perzentile, der Interquartilsrange (IQR), angegeben.

5.2 Unterscheidung LTBI vs. TB

Zur Beurteilung, ob eine Unterscheidung zwischen TB und LTBI mittels der IP-10 Bestimmung möglich ist, wurden die IP-10-EILSA Werte der TB-Gruppe mit denen der LTBI- Gruppe verglichen. Um beurteilen zu können, ob eine Unterscheidung zwischen LTBI- und TB-Gruppe mittels IGRA möglich ist, wurden ebenso die QFT-IT-Werte der TB- und LTBI-Gruppe verglichen. Es wurde

jeweils der nicht parametrischen Rangsummentest (Mann-Whitney-Test) verwendet.

5.3 Korrelation und Konkordanz der IP-10- und QFT-IT-Ergebnisse

Zur Beurteilung, ob eine Korrelation zwischen den IP-10- und IFN- γ -Konzentrationen in der TB- und LTBI-Gruppe einzeln und zusammengefasst besteht, wurde die lineare Regression berechnet. Des Weiteren wurde als nicht-parametrischer Test der Spearman-Korrelationskoeffizient bestimmt.

Die Konkordanz beider Testverfahren wurde mittels Cohen's kappa beurteilt.

5.4 Korrelation von IP-10 Konzentration und Alter der Patienten

Zur Beurteilung, ob die sezernierte IP-10-Plasmakonzentration mit dem Alter der Kinder korreliert, wurde ebenso die lineare Regression und die Spearman-Korrelationsanalyse verwendet.

6. Ethik

Im Rahmen vorangegangener Studien zur Untersuchung des QFT-IT- und T-Spot-Testes im Kindesalter von 2006 bis November 2009 wurden die Patienten selber und/oder ein zugehöriger Erziehungsberechtigter befragt, ob sie der Datenspeicherung zur Person und Testergebnissen sowie der Asservierung von Blutüberständen zu Forschungszwecken zustimmen. Die Patienteneinwilligung erfolgte in schriftlicher Form.

Die Ethikkommission der Charité, Berlin stimmte dem Erweiterungsantrag zur Verwendung der gespeicherten Daten und asservierten Proben im Rahmen des Dissertationsvorhabens zu (Antragsnummer: EA2/028/04, 27.11.2009, siehe Anhang)

In dieser Studie wurden nach Abschluss des experimentellen Studienanteils, ausschließlich anonymisierte Datensätze zur Auswertung der gemessenen Werte verwendet.

Die Datenerhebung und diagnostischen Untersuchungen der vorgestellten Studie galten der routinemäßigen Diagnosestellung und wurden nicht zu Forschungszwecken für die Studien erhoben bzw. durchgeführt.

4. Ergebnisse

1. Charakteristika der Studienpopulation

Mittels der QFT-IT-Datenbank wurden 116 Kinder von Januar 2008 bis November 2009 erfasst, von denen 48 Kinder in die Studie eingeschlossen wurden. Von diesen 48 Kindern waren 11 an einer TB, 14 an einer LTBI, 8 an einer NTM-Erkrankung und 15 an einer AWI erkrankt. Das mittlere Alter aller Kinder betrug 54 Monate. Das jüngste teilnehmende Kind war 13 Monate und das älteste 107 Monate alt. 31 (65%) der teilnehmenden 48 Kinder waren männlich.

Tabelle 2 fasst die einzelnen Charakteristika der Studienteilnehmer in den vier unterschiedlichen Diagnose-Gruppen zusammen.

		<i>TB</i>	<i>LTBI</i>	<i>NTM</i>	<i>AWI</i>
N		11	14	8	15
Alter	Median (Bereich)	64.5 (19-97)	64.5 (17-95)	56 (16-107)	45 (13-67)
Geschlecht	m/w (m %)	7/4 (63.6)	10/4 (71.4)	4/4 (50)	10/5 (66.7)
TB-Exposition	N	11	14	0	0
THT	THT negativ	0	1	2	8
	THT nicht durchgeführt (%)	2 (18.2)	0 (0)	4 (50)	7 (46.7)
Diagnose bestätigt durch:					
	Kultur, N (%)	10 (90.9)	N/A	6 (75)	N/A
	Histologie, N (%)			2 (25)	

Tabelle 2 zeigt die Charakteristika der Studienteilnehmer in den vier unterschiedlichen Diagnosegruppen. TB= Tuberkulose; LTBI= latente Tuberkuloseinfektion; NTM = nicht-tuberkulöse Mykobakterien; AWI= Atemwegsinfektion; N= Anzahl der jeweiligen Studienteilnehmer; m= männlich; w= weiblich; N/A= nicht verfügbar.

2. IP-10-Konzentration in den drei Stimulationsmodi

2.1 TB-Gruppe

Elf der an Tuberkulose erkrankten Kinder wurden in die TB-Gruppe aufgenommen. Der Median der Null-Werte lag bei 704 pg/ml (IQR: 537 pg/ml – 1.761 pg/ml). Nach Stimulation mit spezifischen TB-Antigenen war die mediane IP-10-Konzentration 14.365 pg/ml (IQR: 10.113 pg/ml – 18.692 pg/ml). Nach Abzug der Null-Werte betrug die mediane IP-10-Konzentration nach Antigen-Stimulation 12.702 pg/ml (IQR: 9.759 pg/ml – 16.339 pg/ml). Nach Mitogen-Stimulation lag die mediane IP-10-Konzentration bei 13397 pg/ml (IQR: 10.182 pg/ml – 23.643 pg/ml). Nach Abzug der Null-Werte war die mediane IP-10-Konzentration nach mitogener Stimulation 12.966 pg/ml (IQR: 9.478 pg/ml – 22.910 pg/ml).

Abbildung 6 zeigt die einzelnen IP-10-Werte der TB-Gruppe für nicht stimulierte Proben, Antigen- und Mitogen-Stimulation mit und ohne Substraktion der Null-Werte.

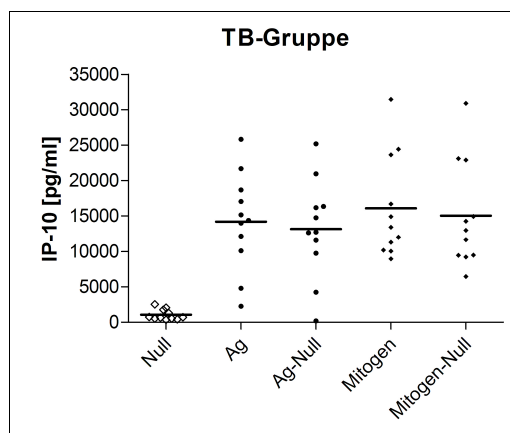


Abbildung 6 zeigt die IP-10-Konzentration in den drei Stimulationsmodi der TB-Gruppe mit und ohne Substraktion der Null-Werte. Die IP-10-Plasmakonzentrationen der Antigen-stimulierten Proben sind signifikant höher, verglichen mit den nicht stimulierten Proben, p -Wert < 0,001. ‚Null‘ steht für die IP-10 Plasmakonzentration ohne Stimulation, ‚Ag‘ nach Antigen und ‚Mitogen‘ nach Mitogen Stimulation.

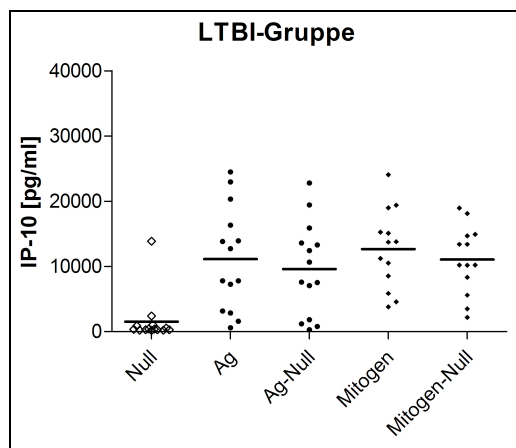


Abbildung 7 zeigt die IP-10-Konzentration in den drei Stimulationsmodi der LTBI-Gruppe mit und ohne Substraktion der Null-Werte. Die IP-10-Plasmakonzentrationen der Antigen-stimulierten Proben sind signifikant höher, verglichen mit den nicht stimulierten Proben, p -Wert < 0,001. Null' steht für die IP-10 Plasmakonzentration ohne Stimulation, 'Ag' nach Antigen und 'Mitogen' nach Mitogen Stimulation.

2.2 LTBI-Gruppe

Vierzehn latent TB-infizierte Kinder wurden in die LTBI-Gruppe aufgenommen. Der Median der Null- Werte lag bei 366,5 pg/ml (IQR: 241,5 pg/ml - 954,0 pg/ml). Nach Stimulation mit spezifischen TB-Antigenen war die mediane IP-10-Konzentration 10.243pg/ml (IQR: 3.008 pg/ml – 18.310 pg/ml). Nach Abzug der Null-Werte betrug die mediane IP-10-Konzentration nach Antigen-Stimulation 9.109 pg/ml (IQR: 1.496 pg/ml-14.737 pg/ml). Nach Mitogen-Stimulation lag die mediane IP-10-Konzentration bei 13.709 pg/ml (IQR: 7.178 pg/ml – 17.114 pg/ml). Nach Abzug der Null-Werte war die mediane IP-10-Konzentration nach mitogener Stimulation 10.232 pg/ml (IQR: 6.936pg/ml – 14.810 pg/ml)

Abbildung 7 zeigt die einzelnen IP-10-Werte der LTBI-Gruppe für nicht stimulierte Proben, Antigen- und Mitogen-Stimulation mit und ohne Substraktion der Null-Werte.

2.3 NTM-Gruppe

Acht an NTM erkrankte Kinder wurden in die NTM-Gruppe aufgenommen. Der Median der nicht-stimulierten IP-10-Werte lag bei 309,0 pg/ml (IQR: 153,5 pg/ml - 501,0 pg/ml). Nach Stimulation mit spezifischen TB-Antigenen war die mediane IP-10 Konzentration 589,0 pg/ml (IQR: 232,5 pg/ml - 622,5 pg/ml).

Nach Abzug der Null-Werte betrug die mediane IP-10-Konzentration nach Antigen-Stimulation 97 pg/ml (IQR: 69,5 pg/ml – 164 pg/ml). Nach Mitogen-Stimulation lag die mediane IP-10-Konzentration bei 11.313 pg/ml (IQR: 6.577 pg/ml – 17.129 pg/ml). Nach Abzug der Null-Werte war die mediane IP-10-Konzentration nach mitogener Stimulation bei 11.197 pg/ml (IQR: 6.386 pg/ml – 16.339 pg/ml).

Abbildung 8 zeigt die einzelnen IP-10-Werte der NTM-Gruppe für nicht stimulierte Proben, Antigen- und Mitogen-Stimulation mit und ohne Substraktion der Null-Werte.

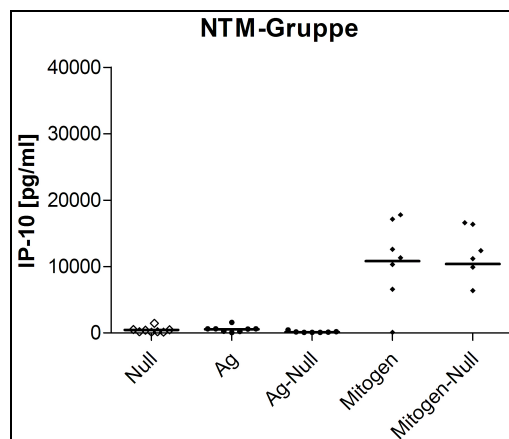


Abbildung 8

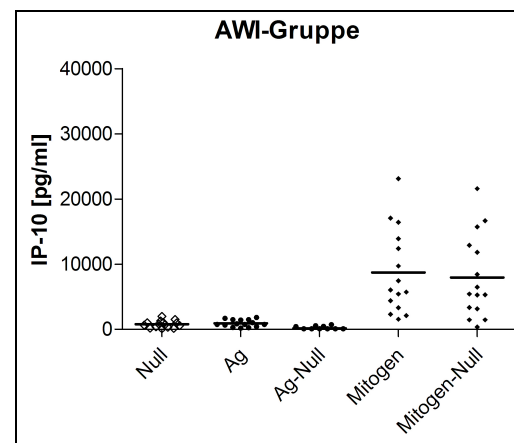


Abbildung 9

Abbildung 8 und 9 zeigen die IP-10-Konzentration in den drei Stimulationsmodi der NTM- und AWI-Gruppe mit und ohne Substraktion der Null-Werte. Die IP-10-Plasmakonzentrationen der Antigen-stimulierten Proben beider Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant von den nicht stimulierten Proben, p -Wert = 0.83. ‚Null‘ steht für die IP-10 Plasmakonzentration ohne Stimulation, ‚Ag‘ nach Antigen und ‚Mitogen‘ nach Mitogen Stimulation.

2.4 AWI-Gruppe

Fünfzehn Kinder mit AWI wurden in die AWI-Gruppe aufgenommen. Der Median der Null- Werte lag bei 694 pg/ml (IQR: 326 pg/ml – 1.048 pg/ml). Nach Stimulation mit spezifischen *M.tuberculosis*-Antigenen war die mediane IP-10-Konzentration 743 pg/ml (IQR: 410 pg/ml - 1476 pg/ml). Nach Abzug der Null-Werte betrug die mediane IP-10-Konzentration nach Antigen-Stimulation bei 84 pg/ml (IQR: -10 pg/ml – 427 pg/ml). Nach Mitogen-Stimulation lag die mediane

IP-10-Konzentration bei 6.056 pg/ml (IQR: 3333 pg/ml - 13933 pg/ml). Nach Abzug der Null-Werte war die mediane IP-10-Konzentration nach mitogener Stimulation 5.401 pg/ml (IQR: 3.135 pg/ml – 12.885 pg/ml).

Abbildung 9 zeigt die einzelnen IP-10-Werte der AWI-Gruppe für nicht stimulierte Proben, Antigen- und Mitogen-Stimulation mit und ohne Substraktion der Null-Werte.

2.5 TB-, LTBI-, NTM- und AWI-Gruppe im Vergleich

Die Antigen-stimulierte IP-10-Konzentration nach Substraktion der Null-Werte der *M. tuberculosis*-Exponierten in den Gruppen (TB und LTBI) war signifikant größer, als die der nicht *M. tuberculosis*-Exponierten (NTM und AWI); *p*-Wert < 0,001 (siehe Abbildung 10).

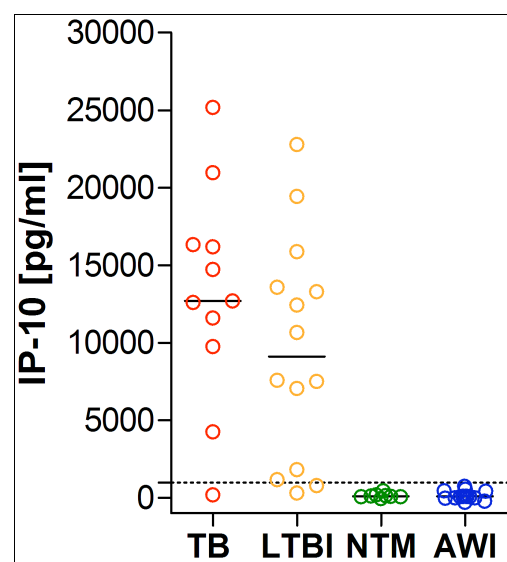


Abbildung 10 zeigt die IP-10-Konzentration der Antigen-stimulierten Proben in der TB-, LTBI-, NTM- und AWI-Gruppe.

3. Unterscheidung von TB und LTBI

Der Median der IP-10-Werte bei dem IP-10-ELISA lag nach Antigen-Stimulation in der TB-Gruppe bei 12.702 pg/ml und in der LTBI-Gruppe bei 9.109 pg/ml (siehe Abbildung 10).

Obwohl der Median der IP-10-Konzentration in der TB-Gruppe im Vergleich zur LTBI-Gruppe erhöht war, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden; p -Wert = 0,24.

4. Vergleich des IP-10-Testes mit dem QFT-IT-Test

Die mediane IFN- γ -Plasmakonzentration nach *M. tuberculosis*-spezifischer Antigen-Stimulation betrug für die TB-Gruppe 453,5 pg/ml (IQR: 370,0 pg/ml – 663,5 pg/ml), für die LTBI-Gruppe 183,5 pg/ml (IQR: 34,25 pg/ml – 529,0 pg/ml), für die NTM-Gruppe 0 pg/ml (IQR: 0 pg/ml – 0 pg/ml) und für die AWI-Gruppe 0 pg/ml (IQR: 0 pg/ml – 2 pg/ml).

Tabelle 3 gibt eine Übersicht der Antigen-stimulierten medianen Plasmakonzentration beider Biomarker in den vier Gruppen.

Mediane Antigen-stimulierte Plasmakonzentration in pg/ml	TB	LTBI	NTM	AWI
IP-10	12702,0	9109,0	97,0	84,0
IFN- γ	453,5	183,5	0,0	0,0

Tabelle 3 zeigt die mediane Antigen-stimulierte Plasmakonzentration in den unterschiedlichen Diagnose-Gruppen für die Biomarker IP-10 und IFN- γ .

4.1 Konkordanz

Der Vergleich der Testergebnisse der TB-, LTBI-, NTM- und AWI-Gruppe des IP-10-ELISAs und des QFT-IT-Testes wurde per Vier-Felder-Tafel dargestellt (siehe Tabelle 4-7).

TB	IFN- γ		
	positiv	negativ	
IP-10			
positiv	10	0	10
negativ	0	1	1
	10	1	11

Tabelle 4. Vier-Felder-Tafel zur TB-Gruppe

LTBI	IFN- γ		
	positiv	negativ	
IP-10			
positiv	11	1	12
negativ	0	2	2
	11	3	14

Tabelle 5. Vier-Felder-Tafel zur LTBI-Gruppe.

NTM	IFN- γ		
IP-10	positiv	negativ	
positiv	0	0	0
negativ	0	8	8
	0	8	8

Tabelle 6. Vier-Felder-Tafel zur NTM-Gruppe.

AWI	IFN- γ		
IP-10	positiv	negativ	
positiv	0	0	0
negativ	0	15	15
	0	15	15

Tabelle 7. Vier-Felder-Tafel zur AWI-Gruppe.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Testergebnisse in der NTM- und AWI-Gruppe konkordant bei allen Patienten negativ waren. Ähnliches galt für die Testergebnisse der TB-Gruppe. 10 der 11 Kinder wiesen ein übereinstimmendes positives Testergebnis auf. Der eine Patient mit kulturell nachgewiesener Tuberkulose wies sowohl ein falsch negatives Testergebnis für den QFT-IT, als auch für den IP-10-ELISA auf. In der LTBI-Gruppe ließ sich die größte Variabilität der Testergebnisse der zwei Tests aufzeigen. Die QFT-IT- und IP-10-ELISA-Ergebnisse von 11 Patienten von 14 sind konkordant positiv. Drei Patienten wiesen negative QFT-IT-Ergebnisse auf. Von diesen drei Patienten waren zwei im IP-10-ELISA ebenso negativ und einer positiv. Das Cohen's Kappa zur Übereinstimmung der beiden Tests betrug in der LTBI-Gruppe $\kappa = 0,76$. Für die TB-, NTM- und AWI-Gruppe $\kappa = 1$. Insgesamt wurde eine hohe Übereinstimmung der beiden Test festgestellt ($\kappa = 0,96$) (siehe Tabelle 8).

	IFN- γ		
IP-10	+	-	
+	21	1	22
-	0	26	26
	21	27	48

Tabelle 8 stellt die IP-10- und QFT-IT-Testergebnisse aller teilnehmenden Patienten dar. „+“ = positives Testergebnis, „-“ = negatives Testergebnis.

4.2 Korrelation

Bei der Untersuchung der Antigen-stimulierten Plasmakonzentration von IP-10 und IFN- γ in der TB- und LTBI-Gruppe wurde eine positive Korrelation festgestellt. Die Korrelation wurde sowohl einzeln für die TB- und LTBI-Gruppe als auch zusammengefasst, also für die Gruppe der *M. tuberculosis*-Infizierten, bestimmt.

Der Spearman-Korrelationskoeffizient (r_{sp}) für die Plasmaspiegel von IP-10 und IFN- γ betrug für die TB-Gruppe $r_{sp} = 0,65$ bei einem p -Wert = 0,03 und für die LTBI- Gruppe $r_{sp} = 0,79$ bei einem p -Wert < 0,001. Für die zusammengefasste TB- und LTBI-Gruppe, die Gruppe der *M. tuberculosis*-Infizierten, betrug der Korrelationskoeffizient $r_{sp} = 0,69$ bei einem p -Wert von < 0,001.

Die lineare Funktion der Regressionsgerade für die TB- und LTBI-Gruppe einzeln und zusammengefasst wird in den Abbildungen 10 bis 12 dargestellt.

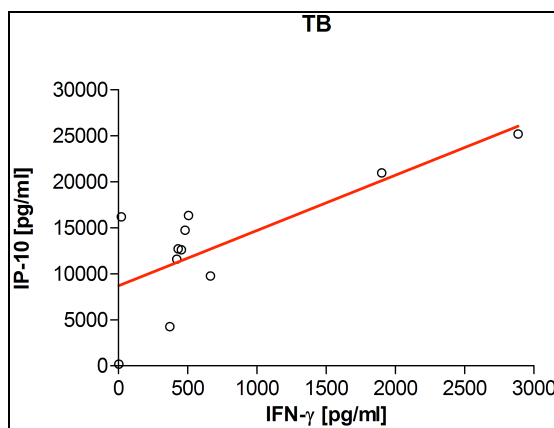


Abbildung 10 stellt Korrelation der IP-10- und IFN- γ - Plasmakonzentration in der TB-Gruppe dar. Die Regressionsgeraden ist in rot abgebildet.

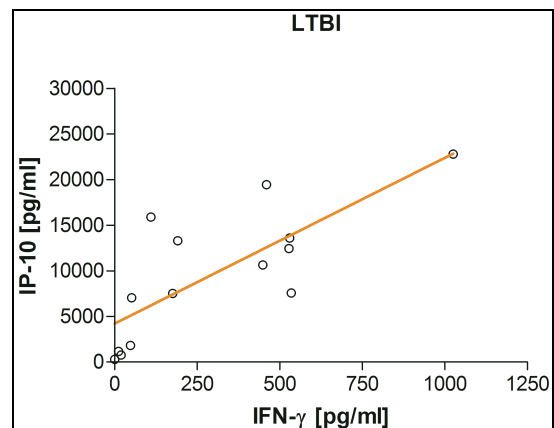


Abbildung 11 stellt Korrelation der IP-10- und IFN- γ - Plasmakonzentration in der LTBI-Gruppe dar. Die Regressionsgeraden ist in orange abgebildet.

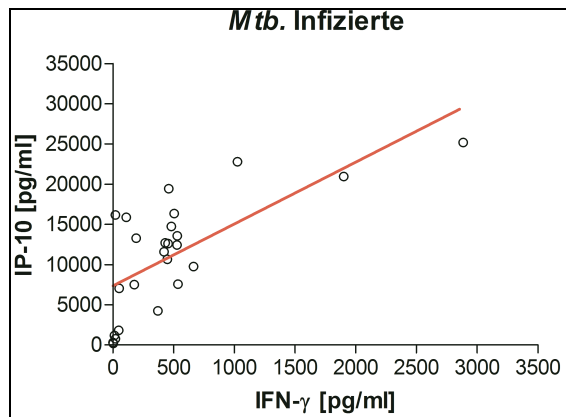


Abbildung 12 stellt Korrelation der IP-10- und IFN- γ -Plasmakonzentration in der Gruppe der *M.tuberculosis*-Infizierten dar. Die Regressionsgeraden ist in rot-orange abgebildet. „*M tb.*“ = *M. tuberculosis*.

Beim Vergleich der Sekretionsmenge von IP-10 und IFN- γ nach Antigen-Stimulation waren die IP-10-Plasmakonzentration im Median 18-fach höher als die von IFN- γ (siehe Abbildung 13).

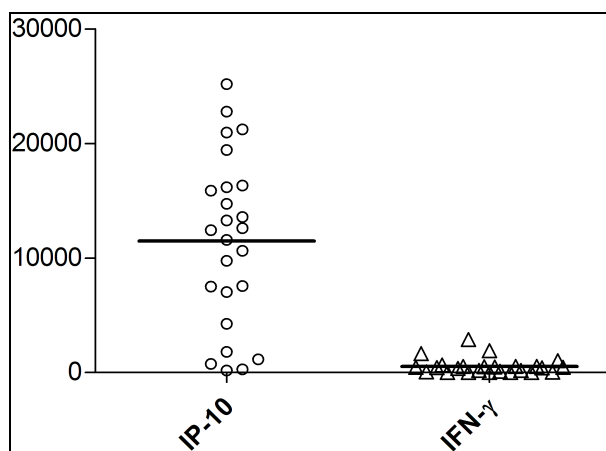


Abbildung 13 stellt die absolute Sekretionsmenge von IP-10 and IFN- γ nach spezifischer TB-Antigen-Stimulation dar.

5. Korrelation der IP-10-Sekretion mit dem Alter

Es konnte keine Korrelation des Alters der Kinder und der IP-10-Konzentration nach Mitogen-Stimulation festgestellt werden.

Der Median der Mitogen-stimulierten Proben nach Abzug der Null-Werte in der TB-, LTBI-, NTM und AWI-Gruppe lag jeweilig bei 12.966 pg/ml; 10.232 pg/ml; 11.197 pg/ml und 5.401 pg/ml.

Die zusammengefasste Spearman-Korrelationskoeffizienten aller Gruppen betrug $r_{sp} = 0,1$ (95% CI -0,19 – 0,37; p -Wert = 0,49). Für die jeweiligen Gruppen separat stellte er sich wie folgt dar: für TB-Gruppe $r_{sp} = 0,01$ (95 % CI -0,61 – 0, 62; $p = 0,99$), für LTBI-Gruppe $r_{sp} = 0,26$ (95 % CI -0,33 – 0,71; p -Wert = 0,37), für NTM-Gruppe $r_{sp} = -0,41$ (95 % CI -0,59 – 0,33; p -Wert = 0,37) und für die AWI-Gruppe $r_{sp} = 0,04$ (95 % CI -0,49 – 0,55; p -Wert = 0,89).

Bei der separaten Betrachtung der Altersgruppen wurde eine mediane Mitogen-stimulierte IP-10-Konzentration der Altersgruppe < 2 Jahre von 10.875 pg/ml (IQR 2.315 – 19.702) festgestellt. Von den sechs Kindern war eines an Tuberkulose erkrankt. Bei den zwei- bis fünfjährigen Kindern lag die mediane IP-10-Konzentration bei 11.694 pg/ml (IQR 5.856-16.157). In dieser Altersgruppe waren vier von 22 Kindern an Tuberkulose erkrankt. Die mediane IP-10-Konzentration nach Mitogen-Stimulation bei den Kindern, die älter als fünf und unter acht Jahren alt waren betrug 13.682 pg/ml (IQR 7.409-20.651), von diesen 17 Kindern waren fünf an Tuberkulose erkrankt.

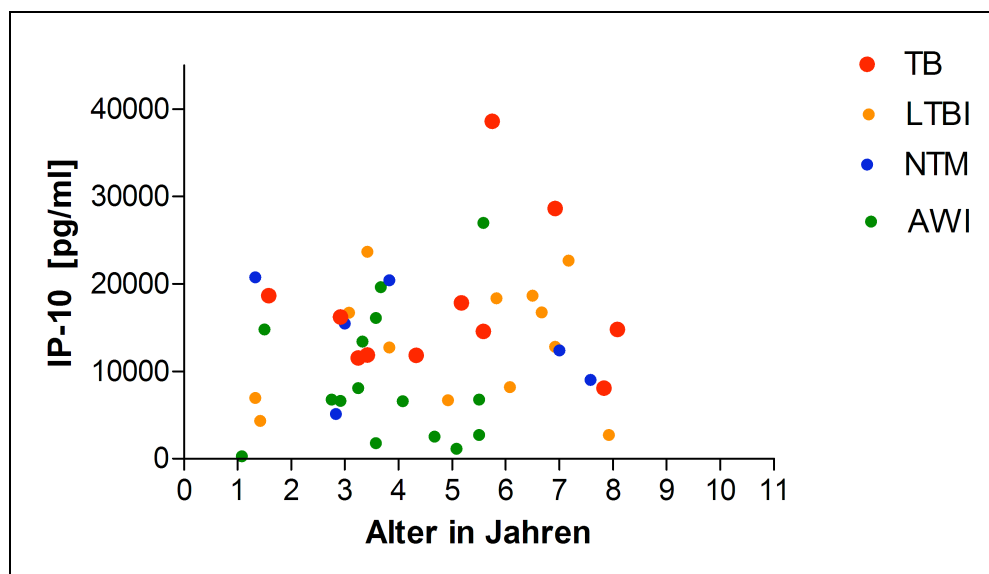


Abbildung 14 zeigt die Mitogen-stimulierten IP-10-Plasmakonzentration und das zugehörige Alter des Kindes zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

5. Diskussion

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde das diagnostische Potential des Biomarkers IP-10 für die Diagnose der Tuberkulose und der latenten Tuberkuloseinfektion im Kindesalter in Deutschland, einem Land mit niedriger Tuberkulose-Prävalenz, untersucht.

Zunächst wurde die IP-10-Plasmakonzentration nach spezifischer *M.tuberculosis*-Antigen-Stimulation bei Kindern mit Tuberkulose, latenter Tuberkuloseinfektion, NTM-Erkrankung oder Atemwegsinfektion bestimmt. Darüber hinaus wurde überprüft, ob mittels IP-10-Bestimmung eine statistisch signifikante Unterscheidung zwischen Tuberkulose und latenter Tuberkuloseinfektion möglich ist. Des Weiteren wurden die IP-10-ELISA-Testergebnisse quantitativ und qualitativ mit denen eines etablierten IFN- γ -basierten Testverfahrens, dem QFT-IT-Test verglichen. Abschließend wurde beurteilt, ob eine Korrelation zwischen der sezernierten IP-10-Konzentration und dem Alter der Testperson besteht.

1. IP-10-Plasmakonzentration nach spezifischer M. tuberculosis - Antigen-Stimulation

In nur wenigen Studien wurde bisher die IP-10-Plasmakonzentration von Kindern mit Tuberkulose oder latenter Tuberkuloseinfektion untersucht. [Ruhwald, Petersen et al., 2008; Lighter et al., 2009; Whittaker et al., 2008; Petrucci et al., 2008]. Im Vergleich zu vorangegangenen Studien wurden in der vorliegenden Doktorarbeit erstmalig auch die IP-10-Konzentrationen bei Kindern mit NTM-Erkrankung untersucht.

Die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift zeigen, dass die IP-10-Plasmakonzentrationen nach Stimulation mit den spezifischen *M. tuberculosis*-Antigenen ESAT-6, CFP-10 und TB7.7 bei Kindern mit aktiver TB oder LTBI im Vergleich zur Kontrollgruppe (NTM- und AWI-Gruppe) signifikant erhöht waren (12702 pg/ml und 9109 pg/ml versus 84 pg/ml und 97 pg/ml, *p*-Wert < 0,001). Es konnte auch gezeigt werden, dass die IP-10-Plasmakonzentrationen der TB-

und LTBI-Patienten nach spezifischer *M. tuberculosis*-Antigen-Stimulation verglichen mit der IP-10-Plasmakonzentration der nicht stimulierten Proben um ein Vielfaches höher waren (14.356 pg/ml versus 704 pg/ml und 10.243 pg/ml versus 366,5 pg/ml, p -Wert < 0,01). In der NTM- und AWI-Gruppe konnte hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen der IP-10-Plasmakonzentration der *M. tuberculosis*-Antigen-stimulierten und nicht stimulierten Proben festgestellt werden (589 pg/ml und 743 pg/ml versus 309 pg/ml und 694 pg/ml, p -Wert = 0,83).

2007 demonstrierten Ruhwald et al. erstmalig, dass die IP-10-Plasmakonzentration bei Tuberkulose-Patienten nach Stimulation mit den Antigenen ESAT-6, CFP-10 und TB7.7 im Vergleich zu einer gesunden Kontroll-Gruppe deutlich erhöht waren [Ruhwald et al., 2007]. Diese spezifischen Antigene werden auch im QFT-IT-Test verwendet. Daher sind die QFT-IT-Überstände eine gute Basis zur Bestimmung der IP-10-Plasmakonzentration und werden somit häufig in IP-10-Studien verwendet. [Ruhwald et al., 2007; Ruhwald, Petersen et al., 2008; Lighter et al., 2009; Petruchi et al., 2008; Whittaker et al., 2008].

Lighter et al. untersuchten den Biomarker IP-10 für die Diagnostik der TB und der LTBI bei Kindern in den USA mit hohem Risiko einer LTBI, mit geringem oder keinem Infektionsrisiko und TB-Erkrankte. Nach *M. tuberculosis*-spezifischer Antigen-Stimulation mit ESAT-6, CFP-10 und TB7.7 waren die IP-10-Plasmakonzentrationen bei Kindern mit hohem Risiko einer LTBI im Vergleich zu Kindern ohne oder mit geringem Infektionsrisiko signifikant erhöht [Lighter et al., 2009]. Whittaker et al. wiesen ebenso nach, dass die IP-10-Plasmakonzentrationen nach spezifischer *M. tuberculosis*-Stimulation bei Kindern in Großbritannien mit TB oder LTBI im Vergleich zu Kindern ohne *M. tuberculosis*-Exposition signifikant erhöht waren [Whittaker et al., 2008]. Beide Studien wurde, wie auch die vorliegenden Doktorarbeit, in Ländern mit niedriger Tuberkulose-Prävalenz durchgeführt [Whittaker et al., 2008; Lighter et al., 2009].

Auch in Ländern mit hoher Tuberkulose-Prävalenz zeigte der Biomarker IP-10 ähnliche Ergebnisse für die Diagnose der latenten Tuberkuloseinfektion und

Tuberkulose im Kindesalter [Ruhwald, Petersen et al., 2008; Petrucci et al., 2008]. Ruhwald et al. verglichen in einer Studie in Nigeria die *M. tuberculosis*-Antigen-stimulierten IP-10-Plasmakonzentration von Kindern mit einem hohen *M. tuberculosis*-Infektionsrisiko mit den Plasmakonzentrationen von Kindern ohne *M. tuberculosis*-Infektionsrisiko. Diese Studie zeigte ebenfalls, dass die IP-10-Plasmakonzentration bei Kindern mit hohem Infektionsrisiko signifikant im Vergleich zu Kindern ohne Infektionsrisiko erhöht war [Ruhwald, Petersen et al., 2008]. Ergebnisse einer Studie aus Brasilien und Nepal demonstrierten, dass IP-10-Plasmakonzentrationen bei Kindern mit hohem Risiko einer LTBI höher im Vergleich zu Kindern mit geringerem Risiko einer LTBI waren [Petrucci et al., 2008]. Yassin et al. ermittelten ebenso in einer Studie in Äthiopien erhöhte IP-10-Plasmakonzentration bei *M. tuberculosis*-exponierten Kindern im Vergleich zu nicht-exponierten Kindern. Die Positiv-Rate der Testergebnisse schien mit der nachgewiesenen Erregerdichte und -anzahl im Sputum der Indexperson positiv zu korrelieren [Yassin et al., 2013].

Die Studienergebnisse in Ländern mit hoher und niedriger Tuberkulose-Prävalenz lassen vermuten, dass die IP-10-Testergebnisse nicht von der lokalen Tuberkulose-Prävalenz beeinflusst werden [Whittaker et al., 2008; Lighter et al., 2009; Ruhwald, Petersen et al., 2008; Petrucci et al., 2008; Yassin et al., 2013; Ruhwald et al., 2012]. Allerdings fehlen bisher Metaanalysen, welche die IP-10-Testung in Ländern unterschiedlicher Tuberkulose-Prävalenz vergleichen.

Im Einklang mit vorangegangenen Studien bestätigen die vorliegenden Ergebnisse der Doktorarbeit, dass IP-10 im Plasma von Kindern mit TB oder LTBI nach spezifischer Antigen-Stimulation im Vergleich zu nicht *M. tuberculosis*-exponierten Kindern signifikant erhöht ist [Lighter et al., 2009; Whittaker et al., 2008; Petrucci et al., 2008; Ruhwald, Petersen et al., 2008].

Des Weiteren konnte erstmals demonstriert werden, dass die IP-10-Plasmakonzentration der Kinder mit NTM-Erkrankung nach Stimulation mit den Antigenen ESAT-6, CFP-10 und TB7.7 nicht erhöht waren. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die genannten Antigene im Genom der in Europa am häufigsten vorkommenden NTM deletiert sind [Rolinck-Werninghaus et al., 2007; Griffith et al., 2007]. Somit konnte der Beweis erbracht werden, dass IP-10 nach

Stimulation mit *M. tuberculosis*-Antigenen spezifisch bei pädiatrischen TB- und LTBI-Patienten, jedoch nicht bei NTM-Erkrankten, sezerniert wird.

In der vorliegenden Studie konnten keine erhöhten IP-10-Plasmakonzentrationen bei Kindern mit Atemwegsinfektionen und ohne *M.tuberculosis*-Exposition gefunden werden. Dies gilt für die Proben ohne Stimulation als auch für die mit spezifischer *M.tuberculosis*-Stimulation.

Allerdings konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass das Chemokin IP-10 als Biomarker inflammatorischer Immunprozesse bei anderen Erkrankungen als AWI erhöht ist. Khandany et al. zeigten, dass die IP-10-Konzentration bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie erhöht war [Khandany et al., 2012]. Auch bei akuter, viral induzierter Asthma-Exazerbation waren die IP-10-Konzentrationen bei nachgewiesener Rhinovirus-Infektion erhöht. [Wark et al., 2007] Das et al. zeigten, dass bei Kindern, die an einer Lupus-Nephritis leiden, die IP-10-Konzentrationen ebenso erhöht sind [Das und Brunner, 2009].

Auf Grund der geringen Datenlage sind weitere Untersuchungen nötig, um zu evaluieren, inwieweit die IP-10-Konzentration von Komorbiditäten der untersuchten Patienten beeinflusst wird.

2. IP-10 als Biomarker zur Unterscheidung zwischen aktiver TB und LTBI

Eine diagnostische Unterscheidung zwischen aktiver Tuberkulose und latenter Tuberkuloseinfektion ist bisher mittels etablierter, immunbasierter Diagnostik nicht möglich [Chegou et al., 2009; Huebner et al., 1993].

Es wurde daher in der vorliegenden Dissertation untersucht, ob sich die IP-10-Plasmakonzentrationen signifikant in den Patientengruppen mit TB und LTBI unterscheiden. Die IP-10-Plasmakonzentrationen der Patientengruppe mit TB waren im Vergleich zur Patientengruppe mit LTBI erhöht, allerdings konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (12.702 pg/ml versus 9.109 pg/ml, *p*-Wert: 0,24).

Hong et al. zeigten ebenso bei Erwachsenen, dass die IP-10-Konzentrationen bei Patienten mit aktiver TB im Vergleich zu LTBI-Patienten zwar erhöht waren,

allerdings konnte auch hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden [Hong et al., 2012; Azzurri et al., 2005].

Whittaker et al. und Lighter et al. stellten ebenfalls für pädiatrische Patienten fest, dass der Biomarker IP-10 nicht zur Unterscheidung von aktiver TB und LTBI im Kindesalter geeignet scheint. Interessanterweise wurde in diesen Studien gezeigt, dass die IP-10-Plasmakonzentrationen bei Kindern mit LTBI höher als bei Kindern mit aktiver TB waren. Allerdings waren auch diese Konzentrationsunterschiede ohne statistische Signifikanz [Whittaker et al., 2008; Lighter et al., 2009].

Bei Betrachtung der individuellen IP-10-Konzentration nach *M. tuberculosis*-unabhängiger Mitogen-Stimulation wurde in der vorliegenden Dissertationsschrift eine starke interindividuelle Varianz der IP-10-Plasmakonzentration festgestellt. Möglicherweise spiegeln diese unterschiedlichen Ergebnisse zu den IP-10-Plasmakonzentrationsdifferenzen die interindividuelle Variabilität der IP-10-Konzentration nach *M. tuberculosis*-Exposition, TB und LTBI wider.

Chegou et al. detektierten andere Biomarker als IP-10 aus den Plasmaüberständen des QFT-IT-Testes und stellten fest, dass die Biomarker „epidermal growth factor“, „soluble CD40 ligand“, „macrophage inflammatory protein-1 β “, „vascular endothelial growth factor“, „transforming growth factor- β “ und Interleukin-1 α für die Unterscheidung von TB und LTBI genutzt werden könnten [Chegou et al., 2009]. Lu et al. untersuchten Transkriptions-Profile von peripheren mononukleären Zellen nach Stimulation mit PPD als spezifische *M. tuberculosis*-Antigene. Bedeutsam für die Unterscheidung von aktiver TB und LTBI scheint laut den Studienergebnissen die Kombination der Genprodukte ATP10A, TLR6 und IP-10 zu sein [Lu et al., 2011].

Unter Berücksichtigung aktuell publizierten Daten und den vorliegenden Ergebnissen der Doktorarbeit ist zu schlussfolgern, dass eine Unterscheidung zwischen TB und LTBI alleinig mittels des Biomarkers IP-10 nicht möglich ist. Ob IP-10 möglicherweise doch in Kombination mit weiteren Genprodukten und Biomarkern zur Unterscheidung von aktiver TB und LTBI beitragen kann, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

3. Der IP-10-Test im Vergleich zu etablierten immunbasierten Testverfahren zur TB- und LTBI-Diagnostik

Zur Beurteilung, in wie weit der Biomarker IP-10 in Zukunft zur Diagnose der TB und LTBI im Kindesalter verwendet werden könnte, wurden die Testergebnisse mit einem anderen immunbasierten diagnostischen Test verglichen.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Testergebnisse des IP-10-ELISAs im Vergleich mit den QFT-IT-Testergebnissen stark qualitativ und quantitativ miteinander korrelieren ($\kappa = 0,96$; $r_{sp} = 0,69$, $P\text{-Wert} < 0,001$).

Anders als in der vorliegenden Studie wurde der IP-10-Test in vorangegangenen Forschungsarbeiten sowohl mit dem QFT-IT-Test als auch mit dem THT verglichen. Diese Daten bestätigen eine starke Korrelation und Konkordanz des IP-10-ELISAs und des QFT-IT-Testes. Beim Vergleich der Testergebnisse des THT und IP-10-Testes wurde allerdings eine geringere Korrelation im Vergleich zum QFT-IT festgestellt [Petrucchi et al., 2008; Ruhwald, Petersen et al., 2008; Lighter et al., 2009; Yassin et al., 2013].

Dies kann möglicherweise mit der eingeschränkten Sensitivität und Spezifität des THT erklärt werden. Schwere Ausprägungen der Tuberkulose führen zu falsch negativen Testergebnissen und zusätzlichen können THT-Kreuzreaktionen bei BCG-geimpften und NTM-erkrankten Patienten auftreten [Huebner et al., 1993; Mahadevan et al., 2005; Haimi-Cohen et al., 2001]

Der hohe Grad der Korrelation des IP-10-Testes mit dem QFT-IT kann durch das enge Zusammenspiel beider Biomarker bei der Immunantwort gegen *M. tuberculosis* erklärt werden. Nach Antigenpräsentation über MHC II-Komplex kommt es zur Zytokin-getriggerten Aktivierung insbesondere spezifischer Th1-Zellen. Diese Lymphozytenaktivierung führt zur IFN- γ -Sekretion. Die freigesetzten Zytokine wiederum aktivieren Monocyten zur IP-10-Sekretion. Rückkoppelnd induziert IP-10 Lymphozyten zur weiteren Sekretion von IFN- γ , welches über IFN- γ zur Autostimulation von IP-10 führt [Ruhwald und Ravn, 2009; Lighter et al., 2009; Chegou et al., 2009; Gangur et al., 1998].

Wie oben erwähnt, korrelierten auch die einzelnen Testergebnisse des IP-10- und QFT-IT-Testes eng miteinander. Drei Studienteilnehmer, ein Kind mit Tuberkulose und zwei Kinder, die mit latenter Tuberkuloseinfektion diagnostiziert wurden, wiesen sowohl im QFT-IT als auch im IP-10-ELISA ein falsch negatives Testergebnis auf. Die Mitogen-stimulierten Plasmakonzentrationen waren für alle drei Studienteilnehmer hoch positiv, so dass man von einer kompetenten Immunantwort ausgehen konnte. Die zwei Kinder der LTBI-Gruppe waren ein einjähriges und ein siebenjähriges Kind. Beide Patienten hatten einen engen Kontakt zu einem Tuberkulose-Index-Fall, einen hoch positiven THT und zeigten keine Symptome einer aktiven Tuberkulose oder NTM-Erkrankung. Auf Grund der hochgradigen Exposition wird ein falsch positiver THT als unwahrscheinlich erachtet.

Der dritte Patient mit positivem THT aber negativem IP-10- und QFT-IT-Test, ein 39 Monate altes Kind, litt unter einer kulturell gesicherten Tuberkulose. Die Mitogen-Kontrolle beider Tests war auch bei diesem Kind deutlich positiv. Für den QFT-IT wurde in vorherige Studien bereits das Vorkommen von falsch negativen Testergebnissen bei der aktiven Tuberkulose festgestellt. Daher ist eine aktive Tuberkulose nicht auf der Basis eines negativen IGRA Testes auszuschließen [Kampmann et al., 2009; Sester et al., 2011].

Falsch negative Testergebnisse scheinen auch häufig mit negativen Mitogen-Kontrollergebnissen assoziiert zu sein. Gare et al. und Connel et al. stellten fest, dass bei der QFT-IT-Testung insbesondere jüngere Kinder mit Tuberkulose, latenter Tuberkuloseinfektion oder gesunde Säuglinge und Kleinkinder auf Grund des unreifen Immunsystems ungültige Testergebnisse mit negativer Mitogen-Kontrolle aufwiesen [Grare et al., 2010; Connel et al., 2010]. Yassin et al. konnten interessanterweise zeigen, dass bei ausgeprägter Tuberkulose im Kindesalter die absolute Anzahl an Lymphozyten sinkt, insbesondere der Anteil an CD3+ und CD4+ T-Zellen, welche für die Sezernierung von IFN- γ von Bedeutung sind [Yassin et al., 2011].

Da allerdings alle drei falsch negativen Kinder eine deutlich positive Mitogen-Kontrolle im IP-10-ELISA und QFT-IT-Test aufwiesen, kann eine generell verminderte Immunabwehr nicht die Erklärung sein. Um das Auftreten von

falsch negativen IP-10- und QFT-IT-Testergebnissen besser zu verstehen, sollten weitere Studien mit größerer Studienteilnehmerzahl konzipiert werden.

Ein Vergleich von Sensitivität und Spezifität des IP-10- und QFT-IT-Testes war in der vorliegenden Studie nicht möglich, da auf Grund der geringen Fallzahl und nur einem diskordanten Ergebnis keine sinnvolle Aussage ermittelbar war.

Die multizentrische Studie von Ruhwald et al. konnte hingegen zeigen, dass man die Sensitivität des QFT-IT-Tests durch zusätzliche IP-10-Testung zur Diagnose von Tuberkulose bei Patienten jeden Alters von 84% auf 87% bei gleichbleibender Spezifität erhöhen kann. In dieser Studie wurde auch festgestellt, dass bei Patienten mit hohem Verdacht auf eine LTBI der IP-10-Test häufiger positiv ausfiel im Vergleich zum QFT-IT-Test. [Ruhwald et al., 2011]. Ähnliches stellten Lighter et al. zur Diagnose der latenten Tuberkuloseinfektion im Kindesalter fest. Bei Kombination der IFN- γ - mit der IP-10-Testung wurde die Sensitivität zur Diagnose der LTBI insbesondere in der Altersgruppe unter 5 Jahren erhöht [Lighter et al., 2009].

Auf Grund der vorgestellten Daten und vorangegangener Studien kann vermutet werden, dass IP-10 trotz der hohen Korrelation und Konkordanz mit dem QFT-IT-Testes als ergänzender Biomarker zur Diagnose von TB und LTBI im Kindesalter hilfreich sein könnte.

4. Diagnostische Vor- und Nachteile des Biomarkers IP-10

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde untersucht, ob die Sekretion von IP-10 mit dem Alter korreliert. Es konnte keine Korrelation zwischen Alter und Mitogen-stimulierter IP-10-Konzentration bei Betrachtung aller Studienteilnehmer gemeinsam festgestellt werden ($r_{sp}= 0,1$; p -Wert = 0,49). Bei separater Betrachtung der Altersgruppen unter 2 Jahren, 2 bis unter 5 Jahren und 5 bis unter 8 Jahren fiel ein nicht signifikanter Anstieg der medianen Mitogen-stimulierten IP-10-Konzentrationen mit zunehmendem Alter auf.

Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen konnte in der Studie von Lighter et al. ebenso wenig ein statistischer Zusammenhang zwischen Mitogen-stimulierter IP-10-Konzentration und dem Alter des Kindes gefunden werden.

Allerdings wurde eine erhöhte Sekretion von IFN- γ bei Kindern über 5 Jahren, im Vergleich zu Kindern unter 5 Jahren festgestellt [Lighter et al., 2009].

Auch die Studien von Mandalakas et al. und Lewinsohn et al. zeigten, dass die Sensitivität der IGRA bei Säuglingen und Kleinkindern herabgesetzt zu sein scheint und die Verwendung der IGRA bei Kindern unter 5 Jahren noch genauer untersucht werden muss [Lewinsohn et al., 2010; Mandalakas et al., 2011]. Auch die Studienergebnisse von Hausstein et al. legten nahe, dass die Wahrscheinlichkeit von ungültigen QFT-IT-Testergebnissen auf Grund von unzureichender IFN- γ -Konzentration nach Mitogen-Stimulation invers mit dem Alter der Kinder korreliert [Hausstein et al., 2009]. Ähnliches konnten Connel et al. feststellen. Die Rate an ungültigen QFT-IT-Testergebnissen war signifikant bei Kindern unter 5 Jahren erhöht [Connel et al., 2010].

Die Testgüte der IGRA und des THT scheint auch von einer HIV-Koinfektion beeinflusst zu sein [Metcalf et al., 2011; James et al., 2013]. Vanini et al. verglichen die Sensitivität vom IP-10-ELISA mit dem QFT-IT bei Erwachsenen mit TB oder LTBI mit HIV-Koinfektion und reduzierter CD4+ Lymphozytenanzahl in einem Land niedriger Tuberkulose-Prävalenz. Sie stellten fest, dass der IP-10-ELISA weniger durch eine reduzierte CD4+ Zellzahl beeinflusst zu sein scheint als der QFT-IT [Vanini et al., 2012]. Goletti et al. untersuchten die IP-10-Plasmakonzentration nach *M. tuberculosis*-spezifischer Antigen- und Mitogen-Stimulation bei HIV-koinfizierten Patienten mit aktiver TB und ohne TB in einem Land mit hoher TB-Inzidenz. Auch deren Studienergebnisse zeigten, dass die Mitogen-stimulierten IP-10-Konzentrationen nicht durch eine HIV-Koinfektion beeinflusst wurde, wohingegen die IFN- γ -Konzentrationen bei Patienten mit HIV-Koinfektion im Vergleich zu HIV-negativen Patienten signifikant geringer waren [Goletti et al., 2010].

Ob die IP-10- im Vergleich zur IFN- γ -Sezernierung tatsächlich altersunabhängig ist und nicht durch eine HIV-Koinfektion beeinflusst wird, sollte in weiteren größeren Studien untersucht werden. Insbesondere wäre eine Betrachtung des immunologischen Zusammenhangs von IP-10-Konzentration und Anzahl der IP-10-sezernierenden Zellen wie Leukozyten und der jeweilige Lympho- und Monozytenanteil interessant.

Das Chemokin IP-10 ist an vielen akut und chronisch inflammatorischen Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie beteiligt (siehe 1.4.2.3). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stellen dar, dass die unstimulierten medianen IP-10-Plasmakonzentrationen aller untersuchten Gruppen unterschiedlich erhöht waren. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die IP-10-Konzentrationen der TB- und AWI Gruppe im Vergleich zur LTBI- und NTM-Gruppe fast um das Doppelte erhöht war (704 pg/ml und 694 pg/ml vs. 366,5 pg/ml und 309 pg/ml). Diese Feststellung spiegelt möglicherweise die vermehrte IP-10-Sekretion bei akuten Erkrankungsgeschehen wider. Jedoch war die IP-10-Konzentration nach spezifischer *M. tuberculosis*-Stimulation in der TB- und LTBI-Gruppe jeweils signifikant im Vergleich zu den unstimulierten-IP-10-Werten erhöht. Auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), die zusätzlich unter TB, LTBI oder keiner Komorbidität litten, wurden erhöhte unstimulierte IP-10-Plasmakonzentrationen festgestellt. Nach spezifischer *M.tuberculosis*-Antigen-Stimulation wurden allerdings auch signifikant erhöhte IP-10-Plasmakonzentrationen bei RA-Patienten mit TB oder LTBI im Vergleich zu RA-Patienten ohne Verdacht auf eine *M. tuberculosis*-Infektion festgestellt [Chen et al., 2011].

Die Testergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit zeigten, dass IP-10 in vielfach höheren Konzentrationen im Vergleich zu IFN- γ sezerniert wird. Selbst nach Subtraktion der unstimulierten IP-10-Konzentration ist die IP-10-Plasmakonzentration noch um ein Vielfaches im Vergleich zur IFN- γ -Konzentration erhöht. Bereits publizierte Daten bestätigen das Testergebnis der vorliegenden Studie [Lighter et al., 2009; Whittaker et al., 2008; Ruhwald et al., 2007]. Auf Grund der hohen Antigen-stimulierten IP-10-Konzentration könnte in Erwägung gezogen werden, den „cut-off“ für positive Testergebnisse für zukünftige IP-10-ELISA herabzusetzen. Somit könnte die Sensitivität der IP-10-Testung erhöht werden. Dies könnte allerdings zur Folge haben, dass der IP-10-Test an Spezifität verlieren würde. Ein Gewinn an Sensitivität mit Verlust von Spezifität ist allerdings in einigen Patientengruppen sehr erwünscht,

beispielsweise bei Säuglingen mit engem Kontakt zu einem Patienten mit einer aktiven TB. Säuglinge entwickeln häufig nach *M. tuberculosis*-Exposition eine aktive TB und erleiden besonders schwere extrapulmonale Ausprägungen, wie eine tuberkulöse Meningitis [Marais, Donald et al., 2005; Magdorf und Detjen, 2008]. Durch die höhere Sensitivität könnten mehr Säuglinge mit TB oder LTBI frühzeitig detektiert und behandelt werden. Allerdings ist die Datenlage zu IP-10 im Säuglingsalter noch zu gering, um die Möglichkeit eines Herabsetzens des „cut-offs“ im Säuglingsalter zu beurteilen.

Ein Herabsetzen des „cut-off“-Wertes ist derzeit wiederum nicht für den QFT-IT möglich. Es konnte gezeigt werden, dass die IFN- γ -Werte in Konzentrationen unterhalb des bestehenden „cut-off“-Wertes der einzelnen Patienten stark variieren [Cellestis, 2011].

Die Forschungsarbeiten von Aabye et al. zeigten, dass auf Grund der hohen IP-10-Konzentration eine Detektierung von IP-10 aus einem Papierfilterstreifen möglich ist. Ein Papierfilterstreifen wird gängigerweise als Methode zum Neugeborenenenscreening verwendet. Aabye et al. untersuchten das Blut von Patienten mit positiven QFT-IT-Testergebnissen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe mit negativen QFT-IT-Ergebnissen. Die Blutproben der Studienteilnehmer wurden mit *M. tuberculosis*-spezifischen Antigenen stimuliert. Ein Teil der Proben wurde zur Isolierung von Plasma verwendet und gespeichert. Ein Plasma-Anteil wurde für den herkömmlichen IP-10-ELISA weiter verwendet. Der restliche Proben- bzw. Plasma-Anteil wurde entweder als Bluts- oder Plasmatropfen auf einen speziellen Papierfilterstreifen appliziert. Anschließend wurde die IP-10-Konzentration auch anhand eines ELISAs aus dem Papierfilterstreifen bestimmt. Die Testergebnisse zeigten, dass die IP-10-Konzentrationen aller drei unterschiedlichen Methoden gut miteinander korrelieren und eine Detektion einer *M. tuberculosis*-Infektion mittels der Verwendung eines Papierfilterstreifens möglich ist [Aabye et al., 2012]. Die Verwendung von Papierfilterstreifen hätte den Vorteil, dass Blut- oder Plasmaproben einfach gespeichert und transportiert werden könnten. Dies träfe beispielsweise auch für Proben aus Ländern mit hoher TB-Inzidenz und

eingeschränkten laboratechnischen Möglichkeiten zu, die mittels des Papierfilterstreifens zu moderneren Laboren mit den nötigen Einrichtungen transportiert werden könnten [Aaybe et al., 2012; Mei et al., 2001].

Cannas et al. zeigten, dass bei Patienten ohne Nierenfunktionsseinschränkung IP-10 im Urin von Patienten mit TB und andern Lungenerkrankungen im Vergleich zu gesunden Studienteilnehmern signifikant erhöht war. Eine einfache non-invasive Diagnostik per Urinstreifen, wie beispielsweise der beta-HCG-Schwangerschaftstest, wäre insbesondere für Kinder von großem Vorteil [Cannas et al., 2010].

Zur Evaluation inwieweit robustere IP-10-Testmethoden in der Praxis zur TB- und LTBI-Diagnostik verwendet werden können, sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig.

5. Einschränkungen der Studie

Die Fallzahlschätzung der vorgestellten Studie ergab, dass zur signifikanten Unterscheidung zwischen den jeweiligen Erkrankungsgruppen (TB-, LTBI-, NTM- und AWI-Gruppe) mittels IP-10 eine minimale Gruppenteilnehmerzahl von 11 benötigt wird. In allen Gruppen bis auf die NTM-Gruppe wurden mindestens 11 oder mehr Kinder eingeschlossen. Trotzdem ist die Studienteilnehmerzahl gering, und somit ist die Aussagekraft der vorliegenden Dissertation eingeschränkt. Daher wurden die vorgestellten Studienergebnisse in Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer kleinen Studien zu IP-10 zur Diagnose einer Tuberkulose und latenten Tuberkuloseinfektion im Kindesalter beurteilt. Lighter et al. untersuchten 7 Kinder mit TB und 12 Kinder mit hohem Verdacht auf eine LTBI, Whittaker et al. untersuchten 17 Kinder mit TB und 16 mit LTBI und Ruhwald et al. untersuchten 59 Kinder mit hohem Verdacht auf eine LTBI [Lighter et al., 2009; Whittaker et al., 2008; Ruhwald, Petersen et al., 2008].

Auf Grund der niedrigen Inzidenz der TB- und NTM-Erkrankungen in Deutschland konnten nicht genügend Kinder unter 5 Jahren für die TB- und

NTM-Gruppe rekrutiert werden. Daher musste das Rekrutierungsalter in den jeweiligen Gruppen auf 8 Jahre erweitert werden. Deshalb ist das mittlere Alter der Studienteilnehmer in den vier Studiengruppen uneinheitlich. Der mittlere Altersunterschied in den vier Gruppen ist allerdings gering, somit kann von einer geringen Beeinflussung der Daten ausgegangen werden.

Zur Diagnosestellung einer LTBI existiert bis heute kein Gold-Standard, daher wird die Diagnose mit Hilfe von Kombinationen diagnostischer Tests erhoben. Es besteht daher die Möglichkeit, dass einige der Studienteilnehmer falsch in die LTBI-Gruppe eingeteilt wurden. Das Fehlen eines internationalen Gold-Standards zur Diagnose der LTBI ist ein globales Problem der TB-Forschung. Um den Begriff der LTBI zu umgehen, wurden in einigen Studien Studienteilnehmer mit engem Kontakt zu einer Tuberkulose-Indexperson mit Studienteilnehmer ohne Kontakt zu einer Tuberkulose-Indexperson verglichen. Die Zuordnung in die LTBI-Gruppe in der vorliegenden Studie basierte auf der Diagnosestellung erfahrener Kinderärzte entsprechend der aktuellen Leitlinien. Somit wird die Wahrscheinlichkeit einer Falschzuordnung als sehr gering geschätzt.

6. Zukunftsperspektiven

In weiteren größeren Studien sollte genauer beurteilt werden, inwieweit der Biomarker IP-10 die bisherige Diagnostik der TB und der LTBI im Kindesalter verbessern könnte. Auf Grund der geringen Tuberkulose-Inzidenz in den Industrienationen sind große Studien mit vielen Studienteilnehmern schwer zu realisieren. Das 2007 gegründete pädiatrische Tuberkulose-Netzwerk (PTBNET) ist eine internationale Vereinigung von pädiatrischen Tuberkulosezentren mit Europa als geographischen Schwerpunkt. Deren Ziel ist es, über gemeinsame „online“- Datenbanken viele Daten zu Epidemiologie, Diagnostik und Therapie der TB und LTBI im Kindesalter zu sammeln. Eine große Studie zum Biomarker IP-10 zur Diagnose der TB und LTBI im Kindesalter über das PTBNET wäre eine Möglichkeit, um die Stellung von IP-10 als zusätzlichen Biomarker zu evaluieren. Um beispielsweise die fragliche altersunabhängige IP-10-Sekretion genauer zu analysieren, sind weitere Studien mit Teilnehmern unter 5 Jahren und

Säuglingen notwendig. Es wäre ebenso interessant zu überprüfen, inwieweit IP-10 unabhängig von der Lymphozytenzahl, insbesondere der CD4+ Lymphozytenzahl, und Monozytenzahl sezerniert wird. Insbesondere sollte auch die Fragestellung geklärt werden, inwieweit die alternative oder additive Bestimmung von IP-10 bei falsch-negativen IGRA-Testergebnissen oder ungültigen IGRA-Testergebnissen hilfreich sein könnte.

In zeitnahen Untersuchungen von Kabeer et al. konnte gezeigt werden, dass IP-10 möglicherweise zum Therapiemonitoring verwendet werden könnte. Die IP-10-Konzentration war nach Ende der TB-Chemotherapie signifikant im Vergleich zum Therapiebeginn erniedrigt [Kabeer et al., 2011]. In einer weiteren Studie von Riou et al. wurde wiederum festgestellt, dass sich das Protein „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) vermutlich wesentlich besser zum Therapiemonitoring eignet als IP-10. Denn anders als bei IP-10 korrelierte, der Konzentrationsabfall von VEGF mit dem Zeitpunkt der Sputum-Konversion [Riou et al., 2012]. Inwieweit der Biomarker IP-10 zum Therapiemonitoring verwendet werden könnte, sollte möglicherweise auch in zukünftigen PTBNET-Studien untersucht werden.

Staaten mit geringer Tuberkulose-Prävalenz sind an kosteneffizienten Screening-Methoden für Menschen aus Risikogruppen wie Arbeiter in Heilberufen, Immigranten aus Ländern mit hoher Tuberkulose-Prävalenz oder Patienten mit HIV-Koinfektion interessiert. In der SWITCH-Studie von Wrighton-Smith et al. wurde festgestellt, dass ein Tuberkulose-Screening mittels Verwendung von IGRAs für Arbeiter in Heilberufen zum einen weniger Kosten im Vergleich zum THT verursacht und zum anderen eine höhere Compliance-Rate aufweist als beim THT. Die Patienten müssen nur einmal zum IGRA-Test und kein zweites Mal wie beim THT erscheinen [Wrighton-Smith et al., 2012]. Auch für die IP-10-Testung würde ein einzelner Besuch zum Ausschluss einer TB oder LTBI genügen. Insbesondere die neuen IP-10-Testmethoden mittels Papierfilter- und Urinstreifen könnten vielversprechend für die kostengünstige TB- und LTBI-Diagnostik werden. Perspektivisch ist eventuell die Herstellung eines unkomplizierten chromatographischen Urin- oder Bluttestes wie bei der HIV-

oder Schwangerschaftsdiagnostik denkbar. Neben der etwaigen kostengünstigeren Untersuchung, wäre es für Patienten aus abgelegenen, dezentralen Gegenden von Vorteil, das Testergebnis zeitnah und direkt vor Ort zu erhalten. Gerade im Kindes- und Kleinkindesalter wäre es zusätzlich wünschenswert, wenn Kapillarblut- oder gar Urinproben zur TB- und LTBI-Diagnostik ausreichen und nicht 3 ml Blut, wie derzeit für den QFT-IT-Test benötigt. Allerdings sind zunächst weitere Testoptimierungen und umfassende Untersuchungen der Testgüte nötig, bevor die neuen IP-10-Testmethoden möglicherweise zur TB- und LTBI-Diagnostik verwendet werden können.

7. Schlussfolgerung

Das Chemokin IP-10 scheint ein geeigneter Biomarker zur Diagnose der Tuberkulose und latenten Tuberkuloseinfektion im Kindesalter zu sein. Ob IP-10 den bereits etablierten diagnostischen Biomarkern überlegen ist oder eine kombinierte Bestimmung von IFN- γ und IP-10 die Sensitivität der *M. tuberculosis*-Diagnostik signifikant verbessern würde, ist in weiteren Studien zu untersuchen.

Auf Grund der generell hohen Konzentration an sezerniertem IP-10, der dadurch möglichen Entwicklung von einfachen und non-invasiven Testverfahren und der eventuell altersunabhängigen Sezernierung von IP-10 liegt die Vermutung nahe, dass IP-10 zur TB- und LTBI-Diagnose gerade im Kindesalter in Zukunft Verwendung finden könnte.

6. Zusammenfassung

1. Zusammenfassung

Einleitung: Zur in-vitro Diagnostik der Tuberkulose (TB) und latenten TB Infektion (LTBI) im Kindesalter werden derzeit zunehmend „Interferon-gamma (IFN- γ) release assays“ (IGRA) verwendet. Die Sensitivität der IGRA insbesondere im Kindesalter ist umstritten. Auch eine diagnostische Unterscheidung zwischen TB und LTBI ist mittels IGRA und anderen bisherigen basierten Testverfahren nicht möglich. In vorangegangenen Studien zeigte sich der Biomarker „IFN- γ -inducible-protein-10“ (IP-10) als viel versprechend zur Diagnose der TB und LTBI.

Ziele: In der vorliegenden Dissertationsschrift wurden die IP-10-Plasmakonzentrationen von Kindern mit TB, LTBI, Atemwegsinfektion (AWI) oder nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM)-Erkrankung ohne Stimulation der Proben, nach unspezifischer Mitogen-Stimulation und nach spezifischer *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*)-Antigen-Stimulation bestimmt. Die Antigen-stimulierten IP-10-Plasmakonzentrationen der TB- und LTBI-Gruppe wurden mit denen der NTM- und AWI-Gruppe verglichen. Darüberhinaus wurde beurteilt, ob eine Unterscheidung zwischen TB und LTBI anhand der IP-10-Plasmakonzentration möglich ist. Außerdem wurde die Konkordanz und Korrelation zwischen dem IP-10-ELISA und QuantiFERON® -TB Gold In-Tube (QFT-IT) Test beurteilt und untersucht, ob der Biomarker IP-10 altersabhängig sezerniert wird.

Material & Methoden: 48 Kinder wurden in die Studie eingeschlossen. Das mittlere Alter der Studienteilnehmer war 54 Monate. Alle Studienteilnehmer wurden zuvor in Deutschland entweder mit einer TB (n=11), LTBI (n=14), NTM (n=8) oder AWI (n=15) diagnostiziert. Unabhängig von der vorliegenden Studie wurden bei allen teilnehmenden Kindern IFN- γ -Werte mittels des QFT-IT-Testes bestimmt. Im Rahmen des QFT-IT wurden die für den Test notwendigen Blutproben entweder nicht stimuliert, mit einer unspezifischen Mitogenen-Substanz oder mit spezifischen *M.tuberculosis*-Antigenen stimuliert. Die jeweiligen Plasma-Überstände wurden asserviert und zur Bestimmung von IP-10

verwendet. Die IP-10-Konzentrationen wurden, in Zusammenarbeit mit dem Klinischen Forschungszentrums der Universität von Kopenhagen, mittels einem zu Forschungszwecken entwickelten ELISAs gemessen.

Ergebnisse: Die IP-10-Plasmakonzentrationen ohne Stimulation, mit unspezifischer Mitogen- und spezifischer Antigen-Stimulation betrug für die TB-Gruppe 704 pg/ml, 12.966 pg/ml und 12.702 pg/ml; für die LTBI-Gruppe 366,5 pg/ml, 10.232 pg/ml und 9.109 pg/ml; für die NTM-Gruppe 309 pg/ml, 11.197 pg/ml und 97 pg/ml; und für die AWI-Gruppe 694 pg/ml, 5.401 pg/ml und 84 pg/ml. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der IP-10-Konzentration der TB- und LTBI-Gruppe festgestellt werden (p -Wert= 0,24). Die IP-10- und IFN- γ -Plasmakonzentrationen der Kinder mit TB und LTBI korrelierten stark miteinander (r_{sp} =0,65; p -Wert = 0,03 und r_{sp} =0,79; p -Wert < 0,001). Der IP-10-ELISA und QFT-IT Test zeigten ebenso eine hohe Konkordanz (κ =0,96). Die IP-10-Sekretion war 18fach höher im Vergleich zur IFN- γ -Sekretion. Es konnte keine Korrelation zwischen dem Alter und der Mitogen-stimulierten IP-10-Konzentration nachgewiesen werden.

Schlussfolgerungen: Die IP-10-Plasmakonzentration von Kindern mit TB und LTBI im Vergleich zu Kindern mit NTM und AWI ist signifikant nach spezifischer *M.tuberculosis*-Antigen-Stimulation erhöht (p -Wert > 0,001). Die qualitativen und quantitativen Testergebnisse des IP-10-ELISAs korrelieren stark mit denen des QFT-IT-Testes. Im Vergleich zu IFN- γ scheint IP-10 in höheren Konzentrationen und möglicherweise unabhängig vom Alter sezerniert zu werden. Das legt die Vermutung nahe, dass IP-10 zur Diagnose der TB und LTBI im Kindesalter in Zukunft Verwendung finden könnte.

2. Summary

Background: Interferon-gamma (IFN- γ) release assays (IGRAs) are the commercial in-vitro tests used to diagnose both tuberculosis (TB) and latent tuberculosis infection (LTBI) in children. Their sensitivity is variable and, as is the case with other immuno-based tests, IGRAs are not able to differentiate

between TB and LTBI. Previous studies showed IFN- γ -inducible-Protein-10 (IP-10) to be a promising new biomarker for the diagnosis of TB and LTBI.

Objectives: In this study the unstimulated IP-10 plasma levels of children with: TB and LTBI, non-tuberculous mycobacterial (NTM) disease and respiratory tract infection (RTI) were measured. They were stimulated with both a mitogen substance and with *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) specific antigens. The *M. tuberculosis* antigen-stimulated IP-10 responses in children with active TB and LTBI were compared to responses from children with NTM disease and RTI. Additionally, an evaluation was made whether the IP-10 concentrations differed significantly compared to the TB- and LTBI-group. The test agreement between IP-10 and the QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT-IT) test was assessed. Further, it was examined whether IP-10 release upon unspecific mitogen stimulation was correlated with age.

Material & Methods: A total of 48 children were recruited (median age of 54 months) that were diagnosed in Germany with either active TB (n=11), LTBI (n=14), NTM disease (n=8), or common RTI (n=15). Prior to this study, IFN- γ levels were measured, using QFT-IT. As part of the QFT-IT, IFN- γ levels were measured in three different plasma samples: without stimulation, after stimulation with an unspecific mitogen substance and after specific *M.tuberculosis*-antigen stimulation. The QFT-IT plasma supernatants were stored. These supernatants were used to determine IP-10 concentrations, using an in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: The median non-stimulated, antigen-stimulated and mitogen-stimulated IP-10 levels in children with active TB were: 704 pg/ml, 12702 pg/ml and 12966 pg/ml; with LTBI they were: 366.5 pg/ml, 9109 pg/ml and 10232 pg/ml; with NTM disease they were: 309 pg/ml, 97 pg/ml and 11197 pg/ml; and with RTI they were 694 pg/ml, 84 pg/ml and 5401 pg/ml. There was no significant difference between the antigen-stimulated IP-10 plasma concentration of the TB- and LTBI-group (p -value = 0.24). A strong correlation between IP-10 and IFN- γ plasma concentration in children with active TB and LTBI was found (r_{sp} = 0.65; p -value 0.03 and r_{sp} = 0.79; p -value < 0.001). The Overall agreement between IP-10 and QFT-IT assays was high (κ = 0.96). IP-10 was released in 18-times higher

concentrations when compared to IFN- γ . IP-10 levels after mitogen stimulation showed no association with age.

Conclusion: Antigen-stimulation induced IP-10 in the blood of children in the TB and LTBI groups, which contrasted with the NTM and RTI groups (p -value < 0.001). There is a strong correlation between the IP-10 and IFN- γ assay. However, compared to IFN- γ the IP-10 levels were higher, and IP-10 was released independent of age. IP-10 therefore may represent an additional biomarker in the paediatric population for the diagnosis of TB and LTBI.

7. Danksagung

Mein Dank gilt all jenen, die mich während meiner Dissertationsarbeit unterstützt haben und in großen Maßen zur Entstehung und Fertigstellung der Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Klaus Magdorf, der mich exzellent den Großteil meiner Dissertationszeit betreute. Er half mir die Studie zu konzipieren, beriet mich, half mir zu jeder Zeit bei jeglicher Fragestellung und motivierte mich zur weiteren Forschungsarbeit.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Rüssmann bedanken, der mich uneingeschränkt unterstützt hat und durch dessen auch finanzielle Unterstützung die Studie ermöglicht werden konnte.

Besonders herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Morten Ruhwald bedanken für die exzellente Anleitung der Laborarbeit und die sofortige Unterstützung bei jeglichen Fragestellungen.

Ich möchte mich auch sehr bei Dr. Anne Detjen und Dr. Florian Marx bedanken. Sie haben mich enorm bei der Abfassung und Fertigstellung der Dissertationsschrift sowie der Publikation unterstützt.

Bei Prof. Neumann möchte ich mich für die statistische Beratung zur Studie bedanken.

Für die Teilnahme an der Dissertationsstudie möchte ich mich recht herzlich auch bei allen Patienten und Angehörigen bedanken.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie, Immunologie und Laboratoriumsmedizin im HELIOS Klinikum Emil von Behring und des Klinischen Forschungszentrum der Universität von Kopenhagen des Hvidovre-Hospitals.

Auch bei Peggy und Oliver Brömme möchte ich mich recht herzlich für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Ebenso möchte ich meinem Freund Simon Hamilton für seine verständnisvolle Unterstützung und Motivation danken.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Gudrun und Erlend Alsleben danken durch deren großzügige und verständnisvolle Unterstützung die Fertigstellung meiner Doktorarbeit und Abschluss meines Studiums nur möglich war.

8. Literaturverzeichnis

1. Aabye M.G., Eugen-Olsen J., Werlinrud A.M., Holm L.L., Tuuminen T., Ravn P., Ruhwald M. (2012) A Simple Method to Quantitate IP-10 in Dried Blood and Plasma Spots. *PloS one*. 7(6):e39228.
2. Aabye M.G., Ruhwald M., Praygod G., Jeremiah K., Faurholt-Jepsen M., Faurholt-Jepsen D., Range N. et al. (2010) Potential of interferon- γ -inducible protein 10 in improving tuberculosis diagnosis in HIV-infected patients. *Eur Respir J*. 36(6):1488-90.
3. American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention (2000) Targeted tuberculin testing, and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 161:221-247.
4. Andersen E.S., Ruhwald M., Moessner B., Christensen P.B., Andersen O., Eugen-Olsen J., Weis N. (2011) Twelve potential fibrosis markers to differentiate mild liver fibrosis from cirrhosis in patients infected with chronic hepatitis C genotype 1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 30(6):761-6.
5. Azzurri A., Sow O.Y., Amedei A., Bah B., Diallo S., Peri G., Benagiano M. et al. (2005) IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect*. 7(1):1-8.
6. Bergamini B.M., Losi M., Vaienti F., D'Amico R., Meccugni B., Meacci M., De Giovanni D. et al. (2009) Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics*. 123(3):e419-24.
7. Beyers N., Gie P.R., Schaaf H.S., Van Zyl S., Talent J.M., Nel E.D., Donald P.R. (1997) A prospective evaluation of children under the age of 5 years living in the same household as adults with recently diagnosed pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1(1):38-43.
8. Bright-Thomas R, Nandwani S, Smith J, Morris JA, Ormerod LP. (2010) Effectiveness of 3 months of rifampicin and isoniazid chemoprophylaxis for the treatment of latent tuberculosis infection in children. *Arch Dis Child* 95(8):600-2.
9. Burrill J., Williams C.J., Bain G., Conder G., Hine A.L., Misra R.R. (2007) Tuberculosis: a radiologic review. *Radiographics*. 27(5):1255-73.
10. Cannas A., Calvo L., Chiacchio T., Cuzzi G., Vanini V., Lauria F.N., Pucci L. et al. (2010) IP-10 detection in urine is associated with lung diseases. *BMC Infect Dis*. 10(1):333.

11. Casanova J.L., Jouanguy E., Lamhamedi S., Blanche S., Fischer A. (1995) Immunological conditions of children with BCG disseminated infection. *Lancet*. 346 (8974):581.
12. Cassidy P.M., Hedberg K., Saulson A., McNelly E., Winthrop K.L. (2009) Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin Infect Dis*. 49(12):e124-9.
13. Cellestis (2011) QuantiFERON-TB gold in-tube precision and reproducibility report, <http://www.cellestis.com/IRM/content/gold/Precisionproductivity.pdf>, 15.10.2013.
14. Chegou N.N., Black G.F., Kidd M., van Helden P.D., Walzl G. (2009) Host markers in QuantiFERON supernatants differentiate active TB from latent TB infection: preliminary report. *BMC Pulm Med* 9(21):1471-2466.
15. Chen D.Y., Shen G.H., Chen Y.M., Chen H.H., Lin C.C., Hsieh C.W., Lan J.L. (2011) Interferon-inducible protein-10 as a marker to detect latent and active tuberculosis in rheumatoid arthritis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 15(2):192-200.
16. Connell T.G., Tebruegge M., Ritz N., Bryant P.A., Leslie D., Curtis N. (2010) Indeterminate interferon-gamma release assay results in children. *Pediatr Infect Dis J*. 29(3):285-6.
17. Cooper A.M. (2009) Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 27:393-422.
18. Das L., Brunner H.I. (2009) Biomarkers for renal disease in childhood. *Curr Rheumatol Rep*. 11(3):218-25.
19. Detjen A.K., Keil T., Roll S., Hauer B., Mauch H., Wahn U., Magdorf K. (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 45(3):322-8.
20. Diel R., Loytved G., Nienhaus A., Castell S., Detjen A., Geerdes-Fenge H., Haas W. et al. (2011) New recommendations for contact tracing in tuberculosis. German Central Committee against Tuberculosis. *Pneumologie* 65(6):359-78.
21. Döffinger R., Altare F., Casanova J.L. (2000) Genetic heterogeneity of Mendelian susceptibility to mycobacterial infection. *Microbes Infect*. 2(13):1553-7.

22. Donald P., Maher S., Quazi S. (2007) A research agenda to promote the management of childhood tuberculosis within national tuberculosis programmes. *Int J Tuberc Lung Dis.* 11(4):370-80.
23. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance report: Tuberculosis surveillance in Europe 2013.
<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Tuberculosis-surveillance-monitoring-2013.pdf>, 23.05.2013.
24. Farhat M., Greenaway C., Pai M., Menzies D. (2006) False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int. J Tuberc Lung Dis.* 10(11): 1192-204.
25. Feja K., Saiman L. (2005) Tuberculosis in children. *Clin Chest Med* 26:295-312.
26. Gangur V., Simons F.E.R., Hayglass K.T. (1998) Human IP-10 selectively promotes dominance of polyclonally activated and environmental antigen- driven IFN-g over IL-4 responses. *FASEB J.* 12(9):705-13.
27. Geha R.S., Merler E. (1974) Response of human thymus-derived (T) and non-thymus derived (B) lymphocytes to mitogenic stimulation in vitro. *Eur J Immunol.* 4(3):193-9.
28. Goletti D., Raja A., Kabeer S.A.B., Rodrigues C., Sodha A., Carrara S., Vernet G. et al. (2010) Is IP-10 an accurate marker for detecting M. tuberculosis-specific response in HIV-infected persons? *PloS one.* 5(9):e12577.
29. Grare M., Derelle J., Dailloux M., Laurain C. (2010) QuantiFERON-TB Gold In-Tube as help for the diagnosis of tuberculosis in a French pediatric hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 66(4):366-72.
30. Griffith D.E., Aksamit T., Brown-Elliott B. A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F., Holland S.M. et al (2007) An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 175(4):367-416.
31. Haimi-Cohen Y., Zeharia A., Mimouni M., Soukhman M., Amir J. (2001) Skin Indurations in Response to Tuberculin Testing in Patients with Nontuberculous Mycobacterial Lymphadenitis. *Clin Infect Dis.* 33(10):1786-8.
32. Haustein T., Ridout D.A., Hartley J.C., Thaker U., Shingadia D., Klein N.J., Novelli V. et al. (2009) The likelihood of an indeterminate test result from a whole-blood interferon-gamma release assay for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children correlates with age and immune status. *Pediatr Infect Dis J.* 28(8):669-73.

33. Herold G. Innere Medizin: Pneumologie: Tuberkulose (2010). S.393-402. Herold, Köln.
34. HersHKovitz I., Donoghue H. D., Minnikin D. E., Besra G. S., Lee O. Y., Gernaey A. M., Galili, E., et al. (2008) Detection and molecular characterization of 9,000-year-old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. *PloS one* 3(10), e3426.
35. Herzog H. (1998) History of tuberculosis. *Respiration* 65(1):5-15.
36. Hesseling A.C., Cotton M.F., Fordham von Reyn C., Graham S.M., Gie R.P., Hussey G.D. (2008) Consensus statement on the revised World Health Organization recommendations for BCG vaccination in HIV-infected infants. *Int J Tuberc Lung Dis* 12(12):1376-9.
37. Hesseling A.C., Rabie H., Marais B.J., Manders M., Lips M., Schaaf H.S., Gie R.P et al. (2006) Bacille Calmette-Guérin vaccine-induced disease in HIV-infected and HIV-uninfected children. *Clin Infect Dis*. 42(4):548-58.
38. Hong J.Y., Jung G.S., Kim H., Kim Y.M., Lee H.J., Cho S.N., Kim S.K. et al. (2012) Efficacy of inducible protein 10 as a biomarker for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Infect Dis*. 16(12):e855-9.
39. Huebner R.E., Schein M.F., Bass J.B.Jr. (1993) The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 17(6):968-75.
40. James P.M., Ganaie F.A., Kadhahalli R.L. (2013) The Performance of QuantiFERON-TB Gold in-Tube (QFT-IT) Test Compared to Tuberculin Skin Test (TST) in Detecting Latent Tuberculosis Infection (LTBI) in the Presence of HIV Coinfection in a High TB-Burden Area with BCG-Vaccinated Population. *J Int Assoc Provid AIDS Care*.
41. Juffermans N.P., Verbon A., van Deventer S.J., van Deutekom H., Belisle J.T., Ellis M.E., Speelman P. et al. (1999) Elevated chemokine concentrations in sera of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients with tuberculosis: a possible role for mycobacterial lipoarabinomannan. *Infect Immun*. 67(8):4295-7.
42. Kabeer S.A.B., Raja A., Raman B., Thangaraj S., Leportier M., Ippolito G., Girardi E. et al. (2011) IP-10 response to RD1 antigens might be a useful biomarker for monitoring tuberculosis therapy. *BMC Infect Dis*. 11(1):135.
43. Kabeer S.A.B., Raman B., Thomas A., Perumal, V., Raja A. (2010) Role of QuantiFERON-TB gold, interferon gamma inducible protein-10 and tuberculin skin test in active tuberculosis diagnosis. *PloS one* 5(2) :e9051.
44. Kampmann B., Whittaker E., Williams A., Walters S., Gordon A., Martinez-Alier N., Williams B. et al. (2009) Interferon-gamma release assays do not

identify more children with active tuberculosis than the tuberculin skin test. *Eur Respir J.* 33(6):1374-82.

45. Kaplan G., Luster A.D., Hancock G., Cohn Z.A. (1987) The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune response in human skin. *J Exp Med.* 166(4):1098-108.
46. Khandany B.K., Hassanshahi G., Khorramdelazad H., Balali Z., Shamsizadeh A., Arababadi M.K., Ostadebrahimi H. et al. (2012) Evaluation of circulating concentrations of CXCL1 (Gro- α), CXCL10 (IP-10) and CXCL12 (SDF-1) in ALL patients prior and post bone marrow transplantation. *Pathol Res Pract.* 208(10):615-9.
47. Koch R. (1882) Die Aetiologie der Tuberculose. *Berliner Klinische Wochenschrift* 19(15):221-230.
48. Krause A.K. (1928) Tuberculosis and public health. *Am Rev Tuberc* 18(3):271-322.
49. Lagging M., Askarieh G., Negro F., Bibert S., Söderholm J., Westin J., Lindh M. et al. (2011) Response prediction in chronic hepatitis C by assessment of IP-10 and IL28B-related single nucleotide polymorphisms. *PloS one* 6(2):e17232.
50. Larrubia J.R., Benito-Martínez S., Calvino M., Sanz-de-Villalobos E., Parra-Cid T. (2008) Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 14(47):7149-59.
51. Leung W.L., Law K.L., Leung V.S., Yip C.W., Leung C.C., Tam C.M., Kam K.M. (2009) Comparison of Intracellular Cytokine Flow Cytometry and an Enzyme Immunoassay for Evaluation of Cellular Immune Response to Active Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 16(3):344-51.
52. Lewinsohn D.A., Gennaro M.L., Scholvinck L., Lewinsohn D.M. (2004) Tuberculosis immunology in children: diagnostic and therapeutic challenges and opportunities. *Int J Tuberc Lung Dis* 8(5):658-74.
53. Lewinsohn D.A., Lobato M.N., Jereb J.A. (2010) Interferon-gamma release assays: new diagnostic tests for Mycobacterium tuberculosis infection, and their use in children. *Curr Opin Pediatr.* 22(1):71-6.
54. Lighter J., Rigaud M., Huie M., Peng C.-H., Pollack H. (2009) Chemokine IP-10: an adjunct marker for latent tuberculosis infection in children. *Int J Tuberc Lung Dis* 13(6):731-6.
55. Ling D.L., Liaw Y.P., Lee C.Y., Lo H.Y., Yang H.L. (2011) Contact investigation for tuberculosis in Taiwan contacts aged under 20 years in 2005. *Int J Tuberc Lung Dis* 15(1):50-5.

56. Lu C., Wu J., Wang H., Wang S., Diao N., Wang F., Gao Y. et al. (2011) Novel biomarkers distinguishing active tuberculosis from latent infection identified by gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells. *PloS one* 6(8):e24290.
57. Luster A.D., Revetch J.V. (1987) Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med.* 166(4):1084-97.
58. Machingaidze S., Wiysonge C.S., Gonzalez-Angulo Y., Hatherill M., Moyo S., Hanekom W., Mahomed H. (2011) The Utility of an Interferon Gamma Release Assay for Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection and Disease in Children: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Infect Dis.*30(8) 694-700.
59. Magdorf K., Detjen A. (2008) Proposed management of childhood tuberculosis in low-incidence countries. *Eur J Pediatr.* 167(8):927-38.
60. Mahadevan B., Mahadevan S., Serane V.T., Narasimhan R. (2005) Tuberculin reactivity in tuberculous meningitis. *Indian J Pediatr.* 72(3):213-15.
61. Mahairas G.G., Sabo P.J., Hickey M.J., Singh D.C., Stover C.K. (1996) Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M.bovis* . *Microbiology* 178(5):1274.
62. Mandalakas A.M., Detjen A.K., Hesseling A.C., Benedetti A., Menzies D. (2011) Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 15(8):1018-32.
63. Mantoux M.C. (1912) La voie intradermique en tuberculinothérapie. *Presse Med* 20:146-148.
64. Marais B.J., Donald P.R., Gie R.P., Schaaf H.S., Beyers N. (2005) Diversity of disease in childhood pulmonary tuberculosis. *Ann Trop Paediatr.* 25(2):79-86.
65. Marai B.J., Gie R.P., Obihara C.C., Hesseling A.C., Schaaf H.S., Beyers N. (2005) Well defined symptoms are of value in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Arch Dis Child* 90(11):1162:5.
66. Marais B.J., Gie R.P., Schaaf H.S., Beyers N., Donald P.R., Starke J.R. (2006) Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges. *Am J Respir Crit Care Med* 173(10):1078-90.
67. Marais B.J., Gie R.P., Schaaf H.S., Hesseling A.C., Enarson D.A, Beyers N. (2006) The spectrum of disease in children treated for tuberculosis in highly endemic area. *Int J Tuberc Lung Dis* 10(7):732-8.

68. Machingaidze S., Wiysonge C.S., Gonzalez-Angulo Y., Hatherill M., Moyo S., Hanekom W., Mohammed H. (2011) The utility of an interferon gamma release assay for diagnosis of latent tuberculosis infection and disease in children: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 30(8):694-700.
69. Mei J.V., Alexander J.R., Adam B.W., Hannon W.H. (2001) The use of filter paper for the analysis of human whole blood specimens. *J. Nutr.* 131:1631. S-6.S.
70. Metcalfe J.Z., Everett C.K., Steingart K.R., Cattamanchi A., Huang L., Hopewell P.C., Pai M. (2011) Interferon- γ Release Assays for Active Pulmonary Tuberculosis Diagnosis in Adults in Low- and Middle-Income Countries: Systematic Review and Meta-analysis. *J Infect Dis.* 204(Suppl 4):S1120-9.
71. Murphy K., Travers P., Walport M. (2008) Janeway's Immunobiology, 7. Edition: Innate Immunity. S.83-6. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; New York (US).
72. Nelson L.J., Wells C.D. (2004) Global epidemiology of childhood tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 8(5):636-47.
73. Nikolova M., Markova R., Drenska R., Muhtarova M., Todorova Y., Dimitrov V., Taskov H. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 75(3):277-81.
74. Oppenheim J.J., Zachariae C.O., Mukaida N., Matsushima K. (1991) Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol.* 9:617-48.
75. Oxford Immunotec. International homepage. T-Spot. TB http://www.oxfordimmunotec.com/How_It_Works_International, 10.07.2013.
76. Pai M., Zwerling A., Menzies D. (2008) Systematic Review : T-Cell – based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection : An Update. *Ann Intern Med.* 149(3):177-84.
77. Petrucci R., Abu Amer N., Gurgel R.Q., Sherchand J.B., Doria L., Lama C., Ravn P. et al. (2008) Interferon gamma, interferon-gamma-induced-protein 10, and tuberculin responses of children at high risk of tuberculosis infection. *Pediatr Infect Dis J.* 27(12):1073-7.
78. Pollock J.M., Andersen P. (1997) The Potential of the ESAT-6 Antigen Secreted by Virulent Mycobacteria for Specific Diagnosis of Tuberculosis. *J Infect Dis.* 175(5):1251-4.

79. Raghuvanshi S., Sharma P., Singh S., Van Kaer L., Das G. (2010) Mycobacterium tuberculosis evades host immunity by recruiting mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (50):21653-8.
80. Rangaka M.X., Wilkinson K.A., Glynn J.R., Ling D., Menzies D., Mwansa-Kambafwile J., Fielding K. et al. (2011) Predictive value of interferon- γ release assays for incident active tuberculosis : a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 12(1):45-55.
81. Rhoades E.R., Cooper A.M., Orme I.M. (1995) Chemokine response in mice infected with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 63(10):3871-7.
82. Riou C., Perez Peixoto B., Roberts L., Ronacher K., Walzl G., Manca C., Rustomjee R. et al. (2012) Effect of standard tuberculosis treatment on plasma cytokine levels in patients with active pulmonary tuberculosis. *PloS one.* 7(5):e36886.
83. Robert Koch-Institut. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2012.
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2012/Ausgaben/12_12.pdf?__blob=publicationFile, 23.05.2013.
84. Robert Koch-Institut. RKI Ratgeber für Ärzte. Tuberkulose.
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html#doc2374486bodyText10, 23.06.2013.
85. Rolinck-Werninghaus C., Magdorf K., Stark K., Lyashchenko K., Gennaro M.L., Colangeli R., Doherty T.M. et al. (2003) The potential of recombinant antigens ESAT-6, MPT63 and mig for specific discrimination of Mycobacterium tuberculosis and M. avium infection. *Eur J Pediatr.* 162 (7-8):534-6.
86. Rosenzweig S.D., Holland S.M. (2005) Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev.* 203:38-47.
87. Ruhwald M., Aabye M.G., Ravn P. (2012) IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions. *Expert Rev Mol Diagn.* 12(2):175-87.
88. Ruhwald M., Bjerregaard-Andersen M., Rabna P., Kofoed K., Eugen-Olsen J., Ravn P. (2007) CXCL10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7.7. *Microbes Infect.* 9(7):806-12.
89. Ruhwald M., Bodmer T., Maier C., Jepsen M., Haaland M.B., Eugen-Olsen J., Ravn P. (2008) Evaluating the potential of IP-10 and MCP-2 as biomarkers for the diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J.* 32(6):1607-15.

90. Ruhwald M., Dominguez J., Latorre I., Losi M., Richeldi L., Pasticci M.B., Mazzolla R. et al. (2011) A multicentre evaluation of the accuracy and performance of IP-10 for the diagnosis of infection with *M. tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 91(3):260-7.
91. Ruhwald M., Petersen J., Kofoed ., Nakaoka H., Cuevas L.E., Lawson L., Squire S.B. et al. (2008) Improving T-cell assays for the diagnosis of latent TB infection: potential of a diagnostic test based on IP-10. *PloS one* 3(8):e2858.
92. Ruhwald M., Ravn P. (2009) Biomarkers of latent TB infection. *Expert Rev. Resp Med*. 3(4):387-401.
93. Schaaf H.S., Zumla A.I.. Tuberculosis. A comprehensive clinical reference: Basic science: The Genus *Mycobacterium* and the *Mycobacterium tuberculosis complex*: Definition of the *M.tuberculosis complex* (2009). S 50. Elsevier, Haryana (India).
94. Schaaf H.S., Zumla A.I.. Tuberculosis. A comprehensive clinical reference: Basic science: The Basic Immunology of Tuberculosis: Interferon- γ (2009). S.83. Elsevier, Haryana (India).
95. Schaaf H.S., Zumla A.I.. Tuberculosis. A comprehensive clinical reference: Basic science: The Basic Immunology of Tuberculosis: (2009). S.75-87. Elsevier; Haryana (India).
96. Schaaf H.S., Zumla A.I.. Tuberculosis. A comprehensive clinical reference: Natural History of Infection and Disease: The natural history of tuberculosis infection and disease in children: (2009). S.133-145. Elsevier; Haryana (India).
97. Schaaf H.S., Zumla A.I.. Tuberculosis. A comprehensive clinical reference: General Clinical Features And Diagnosis: Microbiological Testing for *Mycobacterium tuberculosis* (2009). S 169-78. Elsevier, Haryana (India).
98. Schaberg T., Bauer T., Castell S., Dalhoff K., Detjen A., Diel R., Greinert U. et al. (2012) Empfehlungen zur Therapie, Chemoprävention und Chemoprophylaxe der Tuberkulose im Erwachsenen- und Kindesalter. Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK), Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP). *Pneumologie* 66(3):133-71.
99. Seddon JA, Godfrey-Faussett P, Hesselning AC, Gie RP, Beyers N, Schaaf HS. (2012) Management of children exposed to multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect Dis* 12(6):469-79.
100. Sester M., Sotgiu G., Lange C., Giehl C., Girardi E., Migliori G.B., Bossink A. et al. (2011) Interferon- γ release assays for the diagnosis of

- active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 37(1):100-11.
101. Smallman-Raynor M., Cliff A. (2004) War epidemics. An Historical Geography of Infectious Diseases in Military Conflict and Civil Strife, 1850-2000. 34, Oxford University Press, New York.
 102. Solovic I., Sester M., Gomez-Reino J.J., Rieder H.L., Ehlers S., Milburn H.J., Kampmann B. et al. (2010) The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 36(5):1185-206.
 103. Steingart K.R., Flores L.L., Dendukuri N., Schiller I., Laal S., Ramsay A., Hopewell P.C. et al. (2011) Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 8(8):e1001062.
 104. Sun L., Xiao J., Miao Q., Feng W.X., Wu X.R., Yin Q.Q., Jiao W.W. et al. (2011) Interferon gamma release assay in diagnosis of pediatric tuberculosis: a meta-analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 63(2):165-73.
 105. Tamm I. (1990) The status of tuberculosis since World War II. *Offentl Gesundheitswes*. 52(3):131-5.
 106. Trunz B.B., Fine P., Dye C. (2006) Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* 367(9517):1173-80.
 107. Ulrichs T., Kosmiadi G.A., Jörg S., Pradl L., Titukhina M., Mishenko V., Gushina N. et al. (2005) Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma. *J Infect Dis*. 192(1):89-97.
 108. Uysal G., Köse G., Güven A., Diren B. (2001) Magnetic resonance imaging in diagnosis of childhood central nervous system tuberculosis. *Infection* 29(3):148-53.
 109. Vandercappellen J., Van Damme J., Struyf S. (2008) The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett*. 267(2):226-44.
 110. van de Vosse E., Hoeve M.A., Ottenhoff T.H. (2004) Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis*. 4(12): 739-49.

111. Vanini V., Petruccioli E., Gioia C., Cuzzi G., Orchi N., Rianda A., Alba L. et al. (2012) IP-10 is an additional marker for tuberculosis (TB) detection in HIV-infected persons in a low-TB endemic country. *J Infect.* 65(1):49-59.
112. Verbeke H., Geboes K., Van Damme J., Struyf S. (2012) The role of CXC chemokines in the transition of chronic inflammation to esophageal and gastric cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1825(1):117-29.
113. Wark P.A., Bucchieri F., Johnston S.L., Gibson P.G., Hamilton L., Mimica J., Zummo G. et al. (2007) IFN-gamma-induced protein 10 is a novel biomarker of rhinovirus-induced asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol.* 120(3):586-93.
114. Whittaker E., Gordon A., Kampmann B. (2008) Is IP-10 a better biomarker for active and latent tuberculosis in children than IFN γ ? *PloS one.* 3(12):e3901.
115. World Health Organisation. WHO declares tuberculosis a global emergency (1993). Press release: Geneva: World Health Organization.WHO/31; 23.4.1993.
116. World Health Organisation Report (2012). Global tuberculosis control: The burden of disease caused by TB. World Health Organisation, Geneva Switzerland.
117. Wrighton-Smith P., Sneed L., Humphrey F., Tao X., Bernacki E. (2012) Screening health care workers with interferon- γ release assay versus tuberculin skin test: impact on costs and adherence to testing (the SWITCH study). *J Occup Environ Med.* 54(7):806-15.
118. Yassin M., Petrucci R., Garie KT., Harper G., Teshome A., Arbide I., Asnake G. et al. (2013) Use of tuberculin skin test, IFN- γ release assays and IFN- γ -induced protein-10 to identify children with TB infection. *Eur Respir J.* 41(3):644-8
119. Yassin M., Petrucci R., Garie KT., Harper G., Teshome A., Arbide I., Asnake G. et al. et al. (2011) T-lymphocyte subpopulations in tuberculosis. *Eur Respir J.* 37(5):489-95.
120. Yates-Binder C.C., Rodgers M., Jaynes J., Wells A., Bodnar R.J., Turner T. (2012) An IP-10 (CXCL10)-derived peptide inhibits angiogenesis. *PloS one* 7(7):e40812.
121. Zar H.J., Hanslo D., Apolles P., Swinger G., Hussey G. (2005) Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of

pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. *Lancet* 365(9454):130-4.

122. Zlotnik A., Yoshie O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12(2):121-7.

9. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierenden Zellen
BSA	bovine-serum-albumin
CFP-10	culture filtrate protein 10
CMV	Cytomegalie Virus
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ESAT-6	early secreted antigenic target 6-kDa
HIV	Humanen Immundefizienz-Virus
HRP	horseradish peroxidase
IFN- γ	Interferon-gamma
IGRA	IFN- γ -release assays
IL	Interleukin
IP-10	IFN- γ inducible protein-10
LTBI	Latente Tuberkuloseinfektion
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR	multidrug-resistant
MHC	major histocompatibility complex
MRT	Magnetresonanztomographie
NAT	Nukleinsäureamplifikationstechnik
NTM	nicht-tuberkulöse Mykobakterien
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphat-buffered saline
PPD	purified protein derivat
PTBNET	pädiatrische Tuberkulose-Netzwerk
QFT-IT	QuantiFERON®-TB Gold in-Tube
RA	Rheumatoide Arthritis
RD	region of differentiation
TB	Tuberkulose
T-Spot	T-SPOT®.TB Test
Th-Zelle	T-Helferzellen
THT	Tuberkulin-Hauttest
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	tumornecrosis-alpha
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

2. Ethikvotum



Charité 10117 Berlin

Herrn Professor
Dr. med. U. Wahn
Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und
Jugendmedizin
Klinik für Pädiatrie mit SP
Pneumologie und Immunologie
CVK

Ethikkommission

Vorsitzender: Prof. Dr. jur. R. Seeland

Geschäftsstelle

Geschäftsführerin: Frau Katja Orzechowski, Ärztin
ethikkommission@charite.de

Korrespondenzadresse: Schumannstr. 20/21, 10117 Berlin
Tel.: 030/450-517222
Fax: 030/450-517952

www.charite.de/ethikkommission/

per Fax vorab: 566 931

27.11.09

Eine kontrollierte Pilotstudie zum Stellenwert des QuantiFERON-TB Gold Tests im Vergleich zum T-SPOT-TB bei der Diagnostik mykobakterieller Infektionen im Kindesalter sowie zur Testung neuer mykobakterieller Latenzantigene im Vergleich zum QuantiFERON®-Test bei latent mit M. tuberculosis infizierten gesunden Kindern und Kindern mit tuberkulösen Organmanifestationen

Hier: Dissertationsvorhaben:

IP 10 as a new diagnostic marker for tuberculosis in children

Antragsnummer: EA2/028/04

Vorgang vom 20.11.09, Eingang am 23.11.09

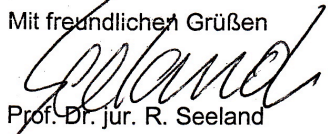
Sehr geehrter Herr Professor Wahn,

hiermit bestätigen wir Ihnen den Eingang des Schreibens von Herrn Dr. K. Magdorf vom 20.11.09 mit der Bitte, dem o.g. Disserattionsvorhaben ein Ethik-Votum zu erteilen.

In dem Forschungsvorhaben werden im Rahmen der o.g. Studie gewonnene und asservierte Blutproben verwendet.

Die Ethikkommission erhebt hiergegen keine ethischen oder rechtlichen Bedenken.

Mit freundlichen Grüßen


Prof. Dr. jur. R. Seeland
Vorsitzender

3. Eidesstaatliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Alsleben, Neele

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Der Biomarker IP-10 für die Diagnose der aktiven Tuberkulose und der latenten Tuberkuloseinfektion im Kindesalter“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Cankarburg, 15.10.2013

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand